

Universitat de Lleida
Facultat de Medicina
Grau en Nutrició Humana i Dietètica



**ESTUDI DE L'ESTABILITAT I FUNCIONALITAT DE
NANOEMULSIONS ENRIQUIDES AMB COMPONENTS
BIOACTIUS**

Autor: Maria Alba Chanco Masip

Curs 2014 - 2015

ESTUDI DE L'ESTABILITAT I FUNCIONALITAT DE NANOEMULSIONS ENRIQUIDES AMB COMPONENTS BIOACTIUS

Treball de Final de Grau presentat per: *Maria Alba Chancho Masip*

Tutores: Isabel Odriozola Serrano

Gemma Oms Oliu

ÍNDEX

1. INTRODUCCIÓ.....	10
1.1. Components bioactius	10
1.1.1. β - carotè.....	10
1.1.2. Vitamina E	12
1.2. Nanotecnologia i nanoemulsions	13
1.3. Composició de les nanoemulsions.....	16
2. JUSTIFICACIÓ	20
3. OBJECTIUS	21
4. MATERIAL I MÈTODES	22
4.1. Materials	22
4.2. Mètodes	23
4.2.1. Preparació de nanoemulsions	23
4.2.2. Caracterització fisicoquímica de les nanoemulsions.....	25
4.2.3. Digestió in vitro.....	29
4.2.4. Extracció de la fracció micel·lar	30
4.2.5. Contingut de β - carotè.....	31
4.2.6. Contingut de vitamina E	31
4.2.7. Determinació de la bioaccessibilitat.....	32
4.2.8. Anàlisi estadístic.....	32
5. RESULTATS I DISCUSSIÓ	33
5.1. Mida de partícula i índex de polidispersió.....	33
5.2. Potencial zeta.....	38
5.3. Viscositat.....	39
5.4. Color.....	40
5.5. Estabilitat	42
5.6. Digestibilitat	43

5.7.	Bioaccessibilitat del β -carotè	45
5.8.	Bioaccessibilitat de la vitamina E.....	47
6.	CONCLUSIONS	49
7.	BIBLIOGRAFIA	50

ÍNDEX DE FIGURES

Figura 1: Estructura química del β - carotè.....	11
Figura 2: Imatge de l'ultrasons.....	23
Figura 3: Escalfament de l'oli en la placa.....	23
Figura 4: Imatge de l'equip Mastersizer.....	26
Figura 5: Imatge del Viscosímetre.....	27
Figura 6 i 7: Diagrama de Hunter Lab.....	28
Figura 8: Mida de partícula de les nanoemulsions analitzades.....	33
Figura 9: Índex de polidispersió de les nanoemulsions d'oli de blat de moro.....	35
Figura 10: Índex de polidispersió de les nanoemulsions d'oli de nous.....	35
Figura 11: Índex de polidispersió de les nanoemulsions d'oli d'oliva verge extra.....	36
Figura 12: Índex de polidispersió de les nanoemulsions de barreja d'olis.....	36
Figura 13: Potencial zeta de les nanoemulsions analitzades.....	38
Figura 14: Viscositat de les nanoemulsions analitzades.....	39
Figura 15: Color de les nanoemulsions analitzades.....	41
Figura 16: Estabilitat de les nanoemulsions analitzades.....	42
Figura 17: Digestibilitat de les nanoemulsions analitzades.....	44
Figura 18: Bioaccessibilitat del β -carotè.....	45
Figura 19: Bioaccessibilitat de la vitamina E.....	47

ÍNDIX DE TAULES

Taula 1: Composició de l'oli de blat de moro (per 100 grams de porció comestible).....	17
Taula 2: Composició de l'oli d'oliva verge extra (per 100 grams de porció comestible).....	17
Taula 3: Composició de l'oli de nous (per 100 grams de porció comestible).....	18
Taula 4: Composició de les emulsions d'oli de blat de moro.....	24
Taula 5: Composició de les emulsions d'oli de nous.....	24
Taula 6: Composició de les emulsions d'oli d'oliva verge extra.....	24
Taula 7: Composició de les emulsions de la barreja d'olis.....	24
Taula 8: Índex de polidispersió de les nanoemulsions analitzades.....	37

RESUM

Actualment es coneixen una gran varietat de components bioactius de gran interès científic degut als múltiples efectes beneficiosos per la salut.

L'ús dels components bioactius com ingredients funcionals és limitat ja que són difícils d'incorporar als aliments. S'ha demostrat que la nanotecnologia facilita la incorporació d'aquests components en matrius alimentaries.

L'objectiu d'aquest treball és obtenir nanoemulsions estables a base de diferents tipus d'oli (oli de blat de moro, oli de nous i oli d'oliva verge extra) enriquits amb β - carotè i vitamina E i amb diferents concentracions de lecitina (0, 0'5 i 1%). Es pretén estudiar les característiques fisicoquímiques de les nanoemulsions (mida de partícula, potencial zeta, viscositat, color i estabilitat). A més a més, s'avaluarà la digestibilitat i bioaccessibilitat *in vitro* del β - carotè i de la vitamina E de les nanoemulsions que presentin millors propietats fisicoquímiques i s'analitzaran els resultats a partir d'un programa estadístic.

El tipus d'oli utilitzat per elaborar la nanoemulsió no té efecte sobre les seves propietats fisicoquímiques. No obstant, els resultats obtinguts demostren la influència de la concentració de lecitina sobre les característiques fisicoquímiques de les nanoemulsions. Un augment de lecitina en la nanoemulsió condueix a una mida de partícula menor, una major negativitat del potencial zeta, una viscositat més elevada i una major estabilitat. El tipus d'oli utilitzat per preparar la nanoemulsió tampoc ha tingut influència sobre la digestibilitat i a la bioaccessibilitat del β - carotè. En canvi, la bioaccessibilitat de la vitamina E s'ha vist lleugerament disminuïda en la nanoemulsió formada per la barreja d'olis.

Tot i que és necessari investigar més en aquest àmbit, els resultats d'aquest treball ens proporcionen informació per millorar l'elaboració de nanoemulsions enriquides.

RESUMEN

Actualmente se conocen una gran variedad de compuestos bioactivos de gran interés científico debido a los múltiples efectos beneficiosos para la salud.

El uso de compuestos bioactivos como ingredientes funcionales es limitado ya que son difíciles de incorporar en los alimentos. Se ha demostrado que la nanotecnología facilita la incorporación de estos compuestos en matrices alimentarias.

El objetivo de este trabajo es obtener nanoemulsiones estables a base de diferentes tipos de aceite (aceite de maíz, aceite de nuez, aceite de oliva virgen extra) enriquecidos con β -caroteno y vitamina E y con diferentes concentraciones de lecitina (0, 0'5 y 1%). Se pretende estudiar las características fisicoquímicas de las nanoemulsiones (tamaño de partícula, potencial zeta, viscosidad, color y estabilidad). Además, se evaluará la digestibilidad y bioaccesibilidad *in vitro* del β -caroteno y de la vitamina E de las nanoemulsiones que presenten mejores propiedades fisicoquímicas y se analizarán los resultados mediante un programa estadístico.

El tipo de aceite utilizado para elaborar la nanoemulsion no tiene efecto sobre sus propiedades fisicoquímicas. Sin embargo, los resultados obtenidos demuestran la influencia de la concentración de lecitina sobre las características fisicoquímicas de las nanoemulsiones. Un incremento de lecitina en la nanoemulsion conduce a un tamaño de partícula menor, una mayor negatividad del potencial zeta, una viscosidad más elevada y una mayor estabilidad. El tipo de aceite utilizado para preparar la nanoemulsion tampoco ha tenido influencia sobre la digestibilidad y bioaccesibilidad del β -caroteno. En cambio, la bioaccesibilidad de la vitamina E se ha visto ligeramente disminuida en la nanoemulsion formada por la mezcla de aceites.

A pesar de que se necesita investigar más en este ámbito, los resultados de este trabajo nos proporcionan información para mejorar la elaboración de nanoemulsiones enriquecidas.

ABSTRACT

Nowadays a wide range of bioactive components with great scientific interest are known due to their several beneficial effects for health.

The use of bioactive compounds as functional ingredients is limited because it's difficult to incorporate them to foods. It has been shown that nanotechnology facilitates the incorporation of these compounds in alimentary matrix.

The aim of this work is to obtain stable nanoemulsions based on different types of oil (corn oil, walnut oil and extra virgin olive oil) β - carotene and vitamin E enriched with and containing different concentrations of lecithin (0, 0'5 and 1%). It aims to study the physical and chemical properties of each nanoemulsion (particle size, zeta potential, viscosity, color and stability). In addition, the *in vitro* digestibility and bioavailability of β - carotene and vitamin E nanoemulsions with the best physical and chemical properties will be evaluated and the results will be analyzed with a statistical program.

The kind of oil used to make the nanoemulsions has no effect on their physicochemical properties. However, the results obtained show the influence of lecithin concentration in the physicochemical nanoemulsion properties. An increase of lecithin concentration leads to decrease the particle size, increase the negativity of zeta potential, increase viscosity and stability. The kind of oil used to make the nanoemulsions neither has influenced on digestibility and bioavailability of β -carotene. However, the bioavailability of vitamin E has been slightly decreased in the nanoemulsion make with oil mixture.

Although a wider investigation in this area is needed, the results of this study give us information to improve the production of nanoemulsions enriched.

1. INTRODUCCIÓ

1.1. Components bioactius

Els *components bioactius* són substàncies, nutritives o no, que es troben en petites quantitats en els aliments, intervenen en el metabolisme secundari dels vegetals i tenen efectes beneficiosos sobre la salut humana (Mendoza et. al., 1999; Urango et. al., 2009).

Actualment, podem trobar en el mercat productes que inclouen components bioactius en la seva composició ja que aquests proporcionen beneficis, produint una millora en la salut i/o benestar o bé disminuint el risc de malaltia (Álvarez i Bague, 2011).

Es coneix l'existència de diversos components bioactius entre els quals es troben el β -carotè i la vitamina E.

1.1.1. β - carotè

Els carotenoids són pigments orgànics liposolubles que pertanyen al grup dels terpens, juntament amb l'esqualè, i presenten propietats antioxidants ja que protegeixen als lípids i als components cel·lulars de l'atac d'agents oxidants com són els radicals lliures o els superòxids. Els podem trobar en els cloroplasts i cromoplasts de plantes, són molt liposolubles i confereixen coloracions intenses (vermell, taronja o groc) als aliments (Meléndez-Martínez et. al., 2004).

Els carotenoides no poden ser sintetitzats per l'organisme humà i s'han de subministrar a través de la dieta. Els aliments d'origen vegetal amb un contingut destacable en carotenoids són les verdures, hortalisses, fruites i cereals, mentre que els aliments d'origen animal que contenen més carotenoids són els crustacis (cantaxantina) i el salmó (astaxantina)(Jáuregui et. al., 2011).

Els carotenoides són fàcilment oxidables degut a la presència d'un gran nombre d'insaturacions (dobles enllaços) a la seva estructura. L'oxidació d'aquests pigments pot fer disminuir el color de l'aliment quan es formen alcohols a partir dels dobles enllaços, o bé pot produir l'aparició de colors estranys quan les molècules es fragmenten i es formen epòxids. Les oxidacions d'aquests pigments estan catalitzades per enzims, com la lipoxigenasa i les peroxidases. També es poden degradar per isomerització dels dobles enllaços passant de formes trans a cis; la isomerització té lloc

sobretot en medi àcid i en presència de llum i calor. Per evitar la degradació, es necessari reduir la temperatura d'emmagatzematge, evitar la presència de llum i disminuir l'acidesa. En molts casos els aliments s'escalden per inactivar els enzims responsables de l'oxidació.

Els carotenoides es diferencien en dos grups en funció de la presència o absència d'oxigen en l'estructura química d'aquests: les xantofil·les, que contenen oxigen, i els carotens, que són estructures sense oxigen (Armstrong i Hearst, 1996).

Els carotens més coneguts són: el licopè (es troba principalment en el tomàquet), el β -carotè (carotè principal de la pastanaga i precursor de la vitamina A) i la luteïna (es localitza en el rovell de l'ou) (Jáuregui et. al., 2011).

El β -carotè és un pigment vermellós que s'incorpora a través de la dieta i es troba en abundància en verdures i fruites. El β -carotè és un compost orgànic que conté 8 unitats d'isoprè i una cadena hidrocarbonada de 40 carbonis amb els extrems en forma cíclica (Figura 1) (George, 2005).

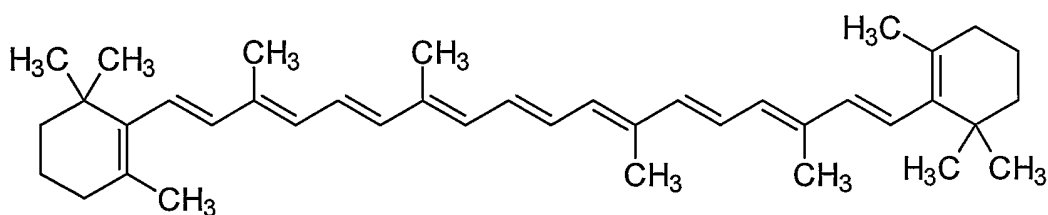


Figura 1: Estructura química del β -carotè

El β -carotè destaca per ser el carotenoide amb major activitat pro-vitamínica A ja que la seva molècula es trenca per la meitat i dona lloc a dues molècules de vitamina A.

Se li atribueixen múltiples propietats beneficioses per la salut humana: és capaç de captar e inactivar radicals lliures, modular el metabolisme de carcinògens, inhibir la proliferació cel·lular, incrementar la diferenciació cel·lular i estimular la comunicació cel·lular.

Totes aquestes propietats ajuden a reduir el risc de desenvolupar certes malalties com les cataractes, la degeneració macular, el càncer, les malalties cardiovasculars i altres malalties com l'Alzheimer i el Parkinson (Qian et. al., 2012).

El β -carotè presenta certes limitacions alhora d'incorporar-lo als aliments. Això es degut a que són substàncies amb inestabilitat química, és a dir, són substàncies amb unes característiques o propietats que no romanen constants a través del temps. A

més a més el β - carotè i presenta baixa solubilitat en aigua i reduïda disponibilitat, és a dir, la proporció d'aquest nutrient que l'organisme humà absorbeix dels aliments és molt baixa. Per tal de millorar la seva incorporació als aliments i incrementar la seva biodisponibilitat, el β - carotè es pot introduir en petites gotes lipídiques disperses en medi aquós (Qian et al., 2012).

1.1.2. Vitamina E

Les vitamines es consideren micronutrients perquè l'organisme les precisa en quantitats petites, però són nutrients essencials, és a dir, són imprescindibles pel normal funcionament de l'organisme i han de ser aportades per la dieta ja que l'organisme no pot sintetitzar-les o, si ho fa, és en quantitat insuficient.

El terme vitamina E agrupa diferents compostos, entre els quals s'inclouen els tocoferols i els tocotrienols.

Els tocoferols deriven del tocol, el qual consisteix en un anell central de cromanol al qual s'uneix una cadena lateral saturada de fitol. Existeixen 4 tocoferols diferents que es diferencien en el nombre i posició dels grups metils que estan units a l'anell central de cromanol, com pot ser alfa, beta, gamma i delta (Carmen et. al., 2002).

La vitamina E es localitza en una gran diversitat d'aliments, principalment d'origen vegetal, com els olis vegetals (de germen de blat, de gira - sol, de llavor de cotó, etc.), productes derivats dels olis, fruits secs (especialment les nous) i cereals. Tot i així, també trobem vitamina E en aliments d'origen animal com el rovell d'ou.

La vitamina E o α -tocoferol és una vitamina liposoluble que actua principalment com antioxidant, eliminant els radicals lliures capaços de danyar les cèl·lules i el material genètic i prevenir l'aparició de certes malalties com l'arteriosclerosi o el càncer.

A més a més, la vitamina E es troba implicada en el funcionament del sistema immunitari, la regulació de la expressió dels gens i molts altres processos metabòlics (Contreras, 2005).

En general totes les vitamines són molt sensibles als tractaments tecnològics i culinaris dels aliments. La vitamina E és estable a tractaments anaerobis tèrmics, però sensible a l'oxigen, a la llum i als lípids oxidables. La velocitat de degradació de la vitamina E s'incrementa en presència d'oxigen molecular i de radicals lliures, així com també a activitats d'aigua molt elevades i molt baixes (Brigelius-Flohé et. al., 2002).

Tal com s'ha esmentat anteriorment, la vitamina E presenta varies funcions en l'organisme humà. La seva deficiència, tot i que no és habitual ja que és una vitamina àmpliament distribuïda en els aliments, pot desestabilitzar les membranes biològiques. D'aquesta manera, els trastorns per deficiència d'aquesta vitamina acostumen a ser problemes neurològics i hemolítics que apareixen a llarg termini. La carència d'aquesta vitamina és greu, especialment en nens i prematurs, en els que es manifesta com fragilitat capil·lar (Brigelius-Flohé et. al., 2002).

La vitamina E s'absorbeix a nivell intestinal, a la porció mitja de l'intestí prim, en presència de sals biliars, lipasa pancreàtica i lípids. La quantitat absorbida pot ser variable depenen de la dieta i de la capacitat de l'individu per absorbir greix. Aproximadament s'absorbeix un 50% de la ingesta diària normal (5 - 15 mg diaris) (Reboul et. al., 2006).

La vitamina E s'emmagatzema principalment al teixit adipós i al fetge i s'elimina principalment per la bilis i la resta mitjançant l'orina (Brigelius-Flohé et. al., 2002).

Els requeriments nutricionals de vitamina E varien segons l'edat i d'altres situacions específiques. S'estima una ingesta de 12 - 15 mg diaris en adults per mantenir una salut òptima (Carmen et. al., 2002). Aquests requeriments s'incrementen al augmentar la ingesta d'àcids grassos poliinsaturats, al incrementar l'edat i en varies malalties d'estrès oxidatiu com les malalties cardiovasculars o el càncer.

1.2. Nanotecnologia i nanoemulsions

La nano ciència fa referència a l'estudi de sistemes nanomèrics. Es tracta d'una ciència que busca entendre els mecanismes que es donen en les nanopartícules, petites porcions de material, típicament de 1 a 200 nanòmetres de diàmetre, que poden fabricar-se a partir de diferents tipus de materials (Invenia, 2009). La nanotecnologia, en canvi, és un camp de la ciència aplicada que busca manipular i controlar aquests mecanismes.

La nanotecnologia presenta la capacitat d'observar, manipular i controlar les propietats de la matèria a escala nanomèrica (1 a 300 nanòmetres) (Rao, 2009).

Actualment la nanotecnologia està prenent molt protagonisme. El seu interès radica en el fet que es confereixen propietats físiques i químiques que difereixen de manera significativa de les habituals, a escala major. Aquestes propietats són les que permeten

dur a terme nombroses millores en un ampli ventall de sectors. Moltes són les àrees de la ciència que estan involucrades en la nanotecnologia; principalment s'hi troben relacionades la medicina, la biologia i la farmacologia, i en l'àrea d'enginyeria la civil, la de construcció, l'electrònica, la mecànica i la química (Chaudhry et. al., 2008). En l'àrea dels aliments, la nanotecnologia presenta una gran varietat d'aplicacions en la qualitat, la seguretat alimentària, el desenvolupament de nous productes i l'envasat i, a més a més, pot ser aplicada en totes les fases d'elaboració del producte alimentari (Weiss et al., 2006).

L'ús de la nanotecnologia en el sector alimentari ha permès aportar propietats funcionals millorades, ha permès l'elaboració de productes més saludables, més resistents i amb una vida útil més llarga.

Algunes de les aplicacions actuals de la nanotecnologia en el sector alimentari son les següents (Dunkan, 2011):

- Envasat d'aliments. Creació d'envasos que incrementen el temps de conservació dels aliments detectant creixement microbià o pèrdua de nutrients, compensant aquests processos amb l'alliberació d'agents antimicrobians, colorants o suplementos nutricionals..
- Incorporació de saboritzants, colorants i additius alimentaris.
- Creació d'aliments amb propietats nutritives, color o sabor en funció de les necessitats i preferències alimentàries individuals, al·lèrgies e intoleràncies alimentàries.
- Reducció del contingut d'hidrats de carboni i greixos i increment del contingut proteic, vitamínic i de fibra amb la finalitat de desenvolupar aliments més saludables.
- Formació de nanopartícules i nanoemulsions estables amb components bioactius per la seva incorporació en aliments.

Una emulsió és una dispersió termodinamicament inestable de dos líquids immiscibles, normalment de naturalesa apolar i polar, en la que un d'ells forma gotes d'una mida petita (fase dispersa o interna), i l'altre forma part de la fase contínua o externa (Muñoz i Alfaro, 2007).

Les nanoemulsions són un tipus d'emulsió formades a partir de partícules de mida nanomèrica. Aquestes acostumen a estar formades per una fase contínua i una dispersa, un agent emulsionant i també poden contenir biopolímers que actuen com a estabilitzants i/o texturitzants (Salvia-Trujillo et al., 2013).

L'ús de nanoemulsions presenta molts avantatges respecte la utilització d'emulsions convencionals ja que tenen una àrea de interfase més elevada. Les nanoemulsions són sistemes que presenten una estabilitat major (Rao i McClements, 2011), un aspecte transparent més atractiu pel consumidor (McClements, 2011) i a més a més tenen unes característiques sensorials com el color i la viscositat de millor acceptació (McClements, 2005). Així doncs, les nanoemulsions són, generalment, més estables que les emulsions convencionals i presenten unes característiques físico-químiques que permeten l'alliberació controlada d'ingredients lipofílics nanoencapsulats en l'interior de les gotes de l'emulsió, facilitant la seva incorporació en els aliments (Sahoo et. al., 2007).

Les nanoemulsions es poden obtenir mitjançant varies tècniques que s'acostumen a classificar en mètodes d'alta i baixa energia (McClements, 2011).

Els mètodes d'alta energia utilitzen dispositius mecànics que tenen la capacitat de generar una intensa i disruptiva força que barreja i altera les fases de l'oli i l'aigua, fet que condueix a la formació de petites gotes. Hi ha tres mecanismes que poden realitzar aquesta funció: les vàlvules d'alta pressió, el microfluiditzador i el sonicador.

Per contra, els mètodes de baixa energia es basen en la formació totalment espontània de petites gotes d'oli de la barreja d'oli amb fase aquosa quan les condicions ambientals o la solució s'alteren. Com a exemple de mètodes de baixa energia trobem la emulsificació espontània i la inversió de fases (Huang et. al., 2010).

Actualment s'està estudiant la producció de nanoemulsions amb la finalitat de protegir components lipofílics funcionals ja que aporten major estabilitat física i incrementen la bioaccessibilitat dels components bioactius presents en l'emulsió (McClements, 2011).

Aquests estudis s'han portat a terme amb components bioactius com les vitamines i els carotenoides (Gonnet et. al., 2010).

Alguns estudis han estudiat les propietats físico-químiques de les nanoemulsions enriquides amb vitamina E (Mayer et. al., 2013; Saberi et. al., 2013; Yang i McClements, 2013). Segons aquests estudis les nanoemulsions presenten una mida de

partícula i un índex de polidispersió menor, major estabilitat i un producte final més transparent que les emulsions convencionals.

Altres estudis han avaluat la digestibilitat (quantitat d'àcids grassos alliberats per unitat de temps) de les nanoemulsions i s'ha vist que la velocitat de digestió dels lípids i la bioaccessibilitat del β - carotè augmenta amb la reducció de la mida de la gota (Salvia-Trujillo et. al., 2013).

L'ús d' α -tocoferol i carotenoids en els aliments és actualment limitat degut a la seva sensibilitat al calor i a l'oxigen, a la baixa solubilitat en aigua i reduïda biodisponibilitat. Una de les solucions per millorar la bioaccessibilitat i biodisponibilitat d'aquests components és introduir-los en petites gotes lipídiques disperses en medi aquós. Aquest procediment permet protegir el component bioactiu en front la interacció d'aquest amb altres components de l'aliment, de l'acció de diferents condicions de processat o conservació i/o de l'activitat enzimàtica en el tracte gastrointestinal (Saberri et. al., 2013).

Així doncs, degut als múltiples avantatges que presenten les nanoemulsions respecte les emulsions convencionals i l'augment de la demanda d'aliments funcionals en el mercat actual (Huang et. al., 2010), es justifica l'ús de la nanotecnologia aplicada en el sector alimentari.

1.3. Composició de les nanoemulsions

Les nanoemulsions sempre estan formades a partir d'una barreja d'oli i aigua. En aquesta barreja s'hi pot afegir estabilitzants. (Constante, 2006).

Els olis i els greixos, en general, tenen unes funcions molt importants en l'organisme, que fa que el seu consum sigui imprescindible. Per una part, tenen un paper estructural, ja que són components majoritaris de les bicapes lipídiques de les membranes cel·lulars. A més a més, tenen un paper regulador i són vehicle de vitamines liposolubles (vitamines A, D, E i K). El seu consum produeix sensació de sacietat, aporten a l'aliment una textura característica i també contribueixen a una millora d'algunes propietats organolèptiques com són el gust i l'olor.

Actualment s'han realitzat múltiples estudis amb la finalitat de determinar l'efecte de la composició de l'oli formador de la nanoemulsió (triglicèrids de cadena mitja i

triglicèrids de cadena llarga) sobre les característiques d'aquesta (Salvia-Trujillo et. al., 2013).

L'oli de blat de moro és un dels olis més utilitzat per l'elaboració de nanoemulsions.

La composició de l'oli de blat de moro, segons les taules de composició de CESNID (2004), és la següent:

Taula 1: Composició de l'oli de blat de moro (per 100 grams de porció comestible)

OLI DE BLAT DE MORO	Per 100 grams
Energia	899.0 kcal
Àcids grassos monoinsaturats	26.1 g
Àcids grassos poliinsaturats	56.7 g
Àcids grassos saturats	12.3 g
Lípids totals	99.9 g
Porció comestible	1.0 g
Vitamina E	30.0 mg

En alguns estudis, també s'ha fet ús de l'oli d'oliva per formar nanoemulsions i s'han estudiat les seves propietats així com també el seu comportament al llarg de tot el procés digestiu (Wulff-Pérez et. al., 2009).

L'oli d'oliva és un tipus d'oli vegetal d'ús principalment culinari que s'extreu del fruit de l'olivera, l'oliva. La dieta mediterrània utilitza pràcticament com única grassa culinària, l'oli d'oliva, que ha demostrat ser molt beneficiós per la salut.

Hi ha diversos tipus d'oli d'oliva verge segons el seu grau d'acidesa: oli d'oliva verge, oli d'oliva verge extra, oli d'oliva verge corrent i oli d'oliva verge llampant. Actualment, l'oli d'oliva verge extra és el més comú.

La composició de l'oli d'oliva verge extra, segons les taules de composició de CESNID (2004), és la següent:

Taula 2: Composició de l'oli d'oliva verge extra (per 100 grams de porció comestible)

OLI D'OLIVA VERGE EXTRA	Per 100 grams
Energia	899.0 kcal
Àcids grassos monoinsaturats	69.4 g
Àcids grassos poliinsaturats	10.8 g

Àcids grassos saturats	14.4 g
Aigua	0.1g
Carotens totals	205.0 µg
Lípids totals	99.9 g
Porció comestible	1.0 g
Vitamina A total	34.0 µg
Vitamina E	12.0 mg

Un altre tipus d'oli que es pot fer servir com a matriu de nanoemulsions és l'oli de nous. Tot i que es tracta d'un oli que procedeix de les nous i, per tant, presenta múltiples efectes saludables, actualment encara no es tenen suficients dades en referència a la seva eficàcia en aquest àmbit.

La composició de l'oli de nous, segons les taules de composició de CESNID (2004), és la següent:

Taula 3: Composició de l'oli de nous (per 100 grams de porció comestible)

OLI DE NOUS	Per 100 grams
Energia	898.0 kcal
Àcids grassos monoinsaturats	17.1 g
Àcids grassos poliinsaturats	69.0 g
Àcids grassos saturats	9.3 g
Lípids totals	99.8 g
Porció comestible	1.0 g
Vitamina E	10.8 mg

La calor, la llum i l'atmosfera que envolta als olis poden degradar els seus àcids grassos, per això és necessari que s'emmagatzemin preservats de la llum, a temperatura ambient i en un recipient tancat (Bailey, 1961).

Com ja s'ha esmentat anteriorment, el tercer component que trobem en una emulsió és l'estabilitzant. Dins dels estabilitzants es troben els surfactants, substàncies que absorbeixen les interfases d'oli i aigua i formen capes protectores al voltant de les gotes, implicant la seva agregació (McClements, 2011). Es poden trobar múltiples

surfactants com per exemple el tween 80, el tween 20, el tween 60, la lecitina, el Span 80, el Span 60, etc.

El tween 20 (polisorbato 20 o polioxietilen(20)sorbitannmonolaurato) és un tensioactiu no iònic que presenta un valor HLB (Hydrophilic-Lipophilic Balance) de 16'7. Aquest valor de l'equilibri hidrofílic-lipofílic permet mesurar el grau d'afinitat per l'aigua (hidròfil) o pels lípids (lipofílic) que presenta el tensioactiu. Així doncs, el tween 20 és adequat per la producció d'emulsions d'oli en aigua i també com a humectant. A més a més, és estable en dissolucions d'electròlits, així com àcids i bases dèbils.

La lecitina és un emulsionant (emulsificant o emulgent) que, com a tal, ajuda a barrejar dos substàncies que normalment són poc miscibles, substàncies difícils d'unificar, facilitant així la formació d'una emulsió (Medina et. al., 2013). Degut a la seva naturalesa lipídica, la lecitina es pot extreure fàcilment ja sigui químicament (utilitzant hexà, acetona, èter de petroli, benzè, etc.) o bé mecànicament a partir de fonts marines, fonts de soja, ous, llet, colza, gira-sol i cotó.

Presenta una baixa solubilitat en aigua però té unes propietats emulsionants molt bones. En solució aquosa, els seus fosfolípids poden formar liposomes, bicapes lipídiques, micel·les o estructures lamel·lars, depenent de la hidratació i de la temperatura.

La lecitina es comercialitza com un suplement alimentari i es troba en molts laboratoris en els que es treballa en la preparació d'emulsions lipídiques ja que en facilita la seva obtenció (Medina et. al., 2013).

2. JUSTIFICACIÓ

La indústria alimentària té un gran interès en el desenvolupament de nous mètodes d'incorporació de components bioactius que són difícils d'introduir en aliments degut a la baixa solubilitat en aigua, escassa estabilitat i reduïda bioaccessibilitat. Segons alguns estudis, les nanoemulsions permeten millorar la incorporació de components bioactius a matrius alimentàries, incrementant la seva funcionalitat. A més a més, les nanoemulsions presenten múltiples avantatges respecte a les emulsions convencionals ja que són més estables i presenten millors característiques físico-químiques (mida de la partícula, potencial zeta, color, viscositat i estabilitat).

Per això s'ha proposat l'estudi de nanoemulsions preparades amb diferents olis (blat de moro, nous, oliva i una barreja dels tres anteriors) enriquits amb β - carotè i vitamina E i diferents concentracions de lecitina.

Així aquestes nanoemulsions es podrien utilitzar per millorar l'estabilitat i la incorporació de components bioactius en aliments, fet que significaria un gran avenç en el desenvolupament de nous productes més saludables.

3. OBJECTIUS

3.1. Objectiu general:

L'objectiu general del present estudi és obtenir nanoemulsions estables a base de diferents tipus d'oli (oli de blat de moro, oli de nous i oli d'oliva verge extra) enriquits amb β - carotè i vitamina E i amb diferents concentracions de lecitina. Es pretén estudiar les característiques fisicoquímiques de cadascuna de les nanoemulsions elaborades. A més a més, s'avaluarà la digestibilitat i bioaccessibilitat *in vitro* del β - carotè i de la vitamina E en les nanoemulsions que presentin millors propietats fisicoquímiques.

3.2. Objectius específics:

- Estudiar les propietats fisicoquímiques (mida de partícula, potencial zeta, color, viscositat i estabilitat) de les nanoemulsions obtingudes a partir de diferents tipus d'olis i diferents concentracions de lecitina.
- Establir les formulacions més adequades per obtenir nanoemulsions amb aplicacions alimentàries.
- Determinar la digestibilitat i la bioaccessibilitat *in vitro* del β - carotè i la vitamina E de les nanoemulsions que presentin millors propietats fisicoquímiques.

4. MATERIAL I MÈTODES

4.1. Materials

Totes les nanoemulsions es van preparar amb els següents elements: oli (oli de blat de moro, oli de nous, oli d'oliva o bé una barreja dels olis anteriors) que constituïa la fase lípida i hidròfoba de l'emulsió, l'aigua milli-Q que representava la part hidrofílica, dos surfactants (tween 20 i lecitina). Les nanoemulsions elaborades es diferenciaven les unes de les altres per dos components: el tipus d'oli utilitzat i la concentració de lecitina incorporada.

L'oli de blat de moro és un oli extret del germen del blat de moro i està compost per àcids grassos saturats (dels quals un 80% són àcid palmític, un 14% àcid esteàric i un 3% àcid araquídric) e insaturats (82,8%).

L'oli de nous és un oli comestible que s'extreu de les nous del noguer comú i presenta un olor i un sabor bastant fort i característic. Aquest oli també és font d'àcids grassos insaturats (86,1%) així com també de saturats (9,3%).

L'oli d'oliva és un oli vegetal extret a partir del suc natural que proporciona l'oliva, fruit de l'olivera. Aquest tipus d'oli conté un 80% d'àcids grassos insaturats, principalment àcid oleic ($C_{18:1}$) i linoleic ($C_{18:2}$). També conté aproximadament un 15% d'àcids grassos insaturats, especialment d'àcid palmític ($C_{16:0}$).

L'aigua milli-Q és un tipus d'aigua purificada i desionitzada en un alt grau mitjançant un procés d'osmosi inversa per un sistema de purificació d'aigua fabricat per Millipore Corporation.

El tween 20 és un compost orgànic que s'utilitza freqüentment per preparar emulsions. Es tracta d'un tensioactiu de tipus polisorbat que, per la seva estabilitat i absència de toxicitat, es utilitza com a detergent i surfactant.

La lecitina és un lípid saponificable amb funció emulgent. Engloba qualsevol substància grassa composta per àcid fosfòric, colina, àcids grassos, glicerol, glicolípid, triglicèrids i fosfolípids.

4.2. Mètodes

4.2.1. Preparació de nanoemulsions

4.2.1.1. Preparació de l'oli enriquit

En aquest treball s'ha utilitzat β - carotè i vitamina E per tal d'enriquir quatre tipus d'oli diferents: oli de blat de moro, oli de nous, oli d'oliva verge extra i una barreja dels tres olis anteriors. Per cada 100 ml d'oli, s'han afegit 250 mg de β - carotè i 250 mg de vitamina E, obtenint així una concentració del 0'25% de cada component bioactiu. Per tal d'aconseguir una dissolució òptima del β - carotè i de la vitamina E en cadascun dels olis, es va repetir el següent procediment dues vegades: sonicació de la barreja durant 1 minut i escalfament de la solució en una placa calefactora i agitadora fins a una temperatura aproximada de 50°C (procurant no sobrepassar els 50°C) durant 5 minuts. L'enriquiment es va realitzar per a cada tipus d'oli de la mateixa manera.



Figura 2: Imatge de l'ultrasons

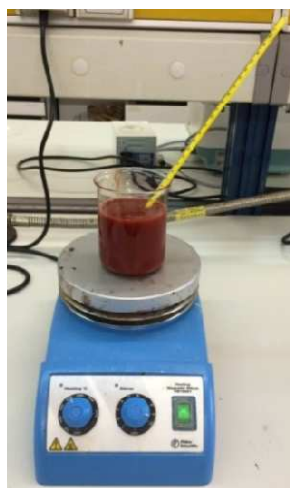


Figura 3: Escalfament de l'oli en la placa

4.2.1.2. Preparació de l'emulsió convencional

Es van preparar un total de 12 emulsions, 3 emulsions per a cada tipus d'oli. La composició de les emulsions variava en el percentatge de lecitina (0%, 0'5% i 1%) i presentava en comú els següents elements: oli enriquit (4%), tween 20 (1%) i aigua. Es van preparar les emulsions que es detallen en les taules que apareixen a continuació:

Taula 4: Composició de les emulsions d'oli de blat de moro

Oli de blat de moro enriquit	Tween 20	Lecitina	Aigua
4%	1%	0%	95%
4%	1%	0'5%	94'5%
4%	1%	1%	94%

Taula 5: Composició de les emulsions d'oli de nous

Oli de nous enriquit	Tween 20	Lecitina	Aigua
4%	1%	0%	95%
4%	1%	0'5%	94'5%
4%	1%	1%	94%

Taula 6: Composició de les emulsions d'oli d'oliva verge extra

Oli d'oliva verge enriquit	Tween 20	Lecitina	Aigua
4%	1%	0%	95%
4%	1%	0'5%	94'5%
4%	1%	1%	94%

Taula 7: Composició de les emulsions de la barreja d'olis

Barreja d'oli enriquit	Tween 20	Lecitina	Aigua
4%	1%	0%	95%
4%	1%	0'5%	94'5%
4%	1%	1%	94%

La preparació de les emulsions es va dur a terme de la següent manera: es van posar 12 ml (4%) d'oli enriquit en un recipient i es va incorporar la lecitina en les proporcions corresponents als percentatges de la taula. Després es va passar la barreja per un homogeneïtzador d'elevada velocitat conegut com túrrax (ULTRA TURRAX, Janke & Kundel, Staegen, Germany) a 9.500 rpm durant 5 min.

Posteriorment es van afegir a la barreja 3 ml (1 %) de tween 20 i la quantitat corresponent d'aigua mil·liQ a temperatura ambient.

Una vegada obtinguda la solució amb tots els components es va procedir a homogeneïtzar la mostra. Això es va dur a terme mitjançant l'exposició d'aquesta a

l'homogeneïtzador d'elevada velocitat (ULTRA TURRAX, Janke & Kundel, Staugen, Germany) a 9500 rpm durant 2 min.

4.2.1.3. Formació de nanoemulsions

Per tal d'obtenir les nanoemulsions es va utilitzar un aparell denominat microfluiditzador (Microfluidics M - 110P). Es tracta d'un equip d'alta pressió (100-150 MPa) que permet disminuir la mida de les partícules de l'emulsió que passa a través d'ell.

Per tal d'obtenir les diferents nanoemulsions, es van col·locar les emulsions convencionals en un embut i es van passar cinc vegades pel microfluiditzador, treballant amb una pressió de 150 MPa.

El microfluiditzador redueix la mida de partícula de la següent manera: l'equip condueix el producte pel seu interior per mitjà d'una vàlvula, arriba a una càmera de tractament que presenta uns microcanals de geometria fixa i es sotmet a elevades velocitats, provocant xocs entre les partícules de la solució i una reducció de la seva mida. Després de la reducció de mida, el producte surt de la càmera circulant per una bobina externa que té forma d'espiral. Aquesta bobina refreda el producte mentre aquest passa a través i, per tant, les temperatures de les no sobrepassen els 20°C en cap moment.

4.2.2. Caracterització fisicoquímica de les nanoemulsions

Després de la preparació de les nanoemulsions es va dur a terme la seva caracterització per tal de conèixer les propietats de les mostres. Es van analitzar característiques com la mida de partícula i índex de polidispersió, potencial zeta, viscositat, color i estabilitat.

4.2.2.1. Mida de la partícula i índex de polidispersió

La mida de les partícules que es troben disperses en una emulsió fa referència al diàmetre que presenten.

La mida de les partícules de cada nanoemulsió es va mesurar per mitjà de la dispersió de llum estàtica amb l'equip Masterziser (Mastersizer 2000, Malvern Instruments Ltd, Worcestershire, Reino Unido).

Les mostres es van diluir amb aigua milli-Q i es van agitar en la unitat de dispersió amb una velocitat de 1800 rpm. Es van realitzar tres mesures de cada nanoemulsió.

El diàmetre de la mida de les partícules es va expressar com el diàmetre mig ponderat de superfície (d_{43}).

A més a més, es va determinar l'índex de polidispersió a través de l'equip de Mastersizer. Aquest índex fa referència a la relació M_p/M_n , és a dir, la relació entre el pes molecular promig en pes (M_p) i el pes molecular promig en nombre (M_n).



Figura 4: Imatge de l'equip Mastersizer

4.2.2.2. Potencial zeta

El potencial zeta és una mesura utilitzada freqüentment en química col·loïdal que descriu la intensitat del camp elèctric estàtic de la capa doble en el límit de la partícula i el fluid. Així

doncs, el potencial zeta es pot considerar el potencial electrostàtic que hi ha entre les capes que es troben situades al voltant de la partícula.

El potencial zeta de cada nanoemulsió es va determinar per mitjà de la mobilitat electroforètica de les gotes de l'emulsió, per dispersió de llum amb un equip làser anomenat Zetasizer (ZetasizerNanoZS, Malvern Instruments Ltd, UK). El seu principi de funcionament consisteix en la determinació de la carga superficial en la interfase de les petites gotes lipídiques disperses en la nanoemulsió. Si la carga es suficientment alta o baixa per assumir que les forces de repulsió entre les gotes son predominants en l'emulsió ($<-30\text{mV}$ o $>30\text{mV}$), no es produiran fenòmens de coalescència i, per tant, la nanoemulsió serà estable.

Les mostres diluïdes 1:10 s'introdueixen en unes cubetes que contenen dos elèctrodes situats un a cada costat. Es van realitzar tres mesures de cada nanoemulsió, utilitzant una mostra per cada mesura, i els resultats es van expressar en mV.

4.2.2.3. Viscositat

La viscositat és la resistència que ofereixen tots els fluids i alguns sòlids al moviment relatiu de les seves partícules, és a dir, a canviar la seva forma sota l'acció d'algunes forces.

La viscositat de les nanoemulsions es va mesurar a través d'un equip denominat SV - 10 Vibro-viscosímetre (A&D Company, Tòquio, Japó) que funciona produint una vibració de 30 Hertz i mantenint, en tot moment, una amplitud constant.

Les nanoemulsions es van introduir en una cubeta específica per aquest equip que presenta una capacitat aproximada de 10 ml. Es van dur a terme tres mesures de cada nanoemulsió i els resultats es van expressar en P/s.



Figura 5: Imatge del Viscosímetre

4.2.2.4. Color

El color de les nanoemulsions es va mesurar per mitjà d'un equip anomenat colorímetre Minolta CR - 400 (KonicaMinoltaSensing, Inc, Osaka, Japó) que funciona a temperatura ambient. Aquest colorímetre fa tres lectures de color diferents per a cada nanoemulsió mesurada i els resultats de la lectura s'expressen a través de tres coordenades (L^* , a^* i b^*), les quals representen:

- Eix perpendicular al pla (L^*): fa referència a la lluminositat, és a dir, als termes clar i fosc.

- Eix de les abscisses (a*): representa la posició entre el color verd i el vermell, de manera que els valors que siguin negatius indicaran color verd i els valors que siguin positius indicaran color vermell
- Eix de les ordenades (b*): fa referència a la posició entre el color groc i el blau, de manera que els valors negatius indicaran color blau i els valors positius indicaran groc.

L'espai de color de Hunter Lab, corresponent al següent diagrama:

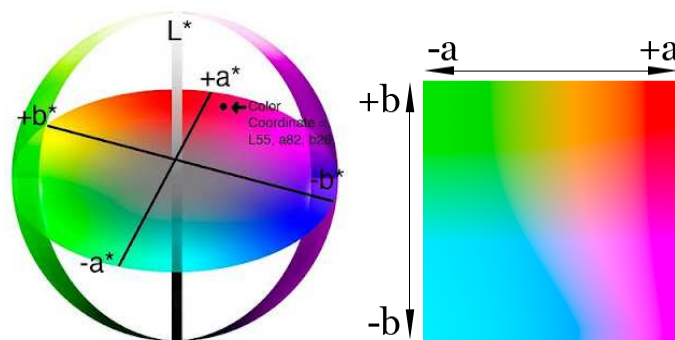


Figura 6 i 7: Diagrama de Hunter Lab

Amb aquests valors podem calcular l'índex de blancor (Whiteness Index). Aquest índex indica la distància a partir d'un blanc "perfecte" (Y=100, a=0 i b=0) mitjançant l'ús d'una equació de diferència de color com la següent:

$$WI = 100 - \sqrt{((100 - L)^2 + (a^2 + b^2))}$$

4.2.2.5. Estabilitat

L'estabilitat de les partícules fa referència a la propietat que presenten certes partícules subatòmiques en desintegrar-se o descompondre's en un altre tipus de partícules.

Per tal de determinar l'estabilitat de les nanoemulsions preparades es va fer ús d'un aparell anomenat Turbiscan (TURBISCAN MA 2000) que permet analitzar de manera ràpida i precisa l'estabilitat de les dispersions concentrades. L'equip permet mesurar les intensitats de llum en transmissió i reflexió en funció de l'alçada de la mostra per detectar el canvi de la mida de partícula en procés de sedimentació o flotació. Per això, l'equip disposa d'un capçal òptic amb una font de llum infraroja i dos detectors que recorren tota l'alçada de la mostra que es troba en l'interior d'un tub de vidre. Amb les

dades recollides d'intensitat de llum s'obtenen uns perfils que ens permeten caracteritzar la nostra dispersió i detectar processos com la sedimentació, la floculació, la coalescència, la separació de fases, la flotació, etc.

A més a més de l'ús del turbiscan també es va determinar l'estabilitat de cada emulsió mitjançant l'observació de la mostra. Es va fer un seguiment de les mostres (emmagatzemades a una temperatura de 4 °C) durant 7 dies per tal d'observar si presentaven separació de fases.

4.2.3. Digestió *in vitro*

Una vegada caracteritzades totes les nanoemulsions es va procedir a la digestió *in vitro* de les mostres amb millors propietats fisicoquímiques. La digestió completa es va dur a terme seguint un model *in vitro* que constava de tres fases: fase bucal, fase gàstrica i fase intestinal.

4.2.3.1. Digestió bucal

En aquesta primera fase es va simular el fluid salival.

Es van barrejar 15 ml de la nanoemulsió preparada amb 15 ml de mucina. Després es va ajustar el pH immediatament a 6,8 i es va incubar la barreja a l'orbital a temperatura de 37 °C durant 10 min. i amb una agitació constant a 100 rpm.

4.2.3.2. Digestió gàstrica

Posteriorment a la fase bucal es va iniciar la digestió gàstrica.

Es van barrejar els 30 ml de la nanoemulsió digerida en la boca amb 30 ml de sals gàstriques preparades mitjançant la dissolució de 2 g de clorur sòdic amb 7 ml d'àcid clorhídric en un litre d'aigua milli-Q i, posteriorment, ajustant el pH a 1'2.

Després de barrejar els 60 ml anteriorment citats es va procedir a ajustar el pH a 2'5 i es va incubar la mostra a l'orbital a temperatura de 37 °C durant 2 h i amb una agitació constant a 100 rpm.

4.2.3.3. Digestió intestinal

Finalment es va procedir a sotmetre la mostra a una digestió intestinal *in vitro*, la qual es va dur a terme mitjançant un dispositiu regulador de pH, simulant la digestió de l'intestí prim (MetrohmUSA, Riverview, FL).

Es van introduir 60 ml de la nanoemulsió digerida en boca i estómac en un bany maria amb una temperatura de 37 °C. Posteriorment es van afegir 8 ml de bilis (47mg/ml) i 4 ml de clorur càlcic (110mg/ml) a la nanoemulsió i es va ajustar el pH a 7. Seguidament es van afegir 5 ml de lipasa pancreàtica i es va anotar el volum (ml) d'hidròxid de sodi utilitzat per neutralitzar l'acidesa que produeixen els àcids grassos lliures, alliberats per acció de la lipasa pancreàtica. La quantitat d'hidròxid de sodi gastat durant la digestió ens permet determinar el grau de digestibilitat de l'oli de la nanoemulsió.

Per tal de conèixer el percentatge d'àcids grassos lliures (% AGL) que s'alliberen durant la digestió es va fer ús de la següent fórmula:

$$\% \text{ AGL} = 100 \times \frac{V_{\text{NaOH}} \times M_{\text{NaOH}} \times M_{\text{oli}}}{2 \times m_{\text{oli}}}$$

On:

V_{NaOH} : volum de NaOH gastat per neutralitzar l'acidesa produïda pels àcids grassos lliures

M_{NaOH} : molaritat del NaOH (0,25M)

M_{oli} : pes molecular de l'oli

m_{oli} : pes total de l'oli inicial present en la barreja (grams)

4.2.4.Extracció de la fracció micel·lar

Després de la digestió de les nanoemulsions, es va procedir a l'extracció de la fracció micel·lar. La nanoemulsió digerida es va centrifugar durant 40 min. a 4000 rpm i a una temperatura de 4 °C. Després d'aquesta centrifuga, en la mostra, es podia observar tres fases diferenciades: una porció en la part més superior del tub formada per petites gotes d'oli no digerit; una porció en la part més profunda del tub de mostra que havia precipitat; una última porció de mostra, anomenada sobrenedant, que es situa al mig del tub i representava la part on es troben solubilitzats els components bioactius.

Per tal d'obtenir el sobrenedant de la mostra digerida centrifugada, és va pipetejar de manera acurada la part superior del tub i aquesta va ser descartada. Finalment, mitjançant una pipeta Pasteur, es va agafar tota la porció de mostra amb els components bioactius solubilitzats (sobrenedant) i es va col·locar en un pot de plàstic.

4.2.5.Contingut de β - carotè

Per tal de determinar el contingut de β -carotè present en cada nanoemulsió, així com en la fracció micel·lar es va procedir a fer la seva extracció. Primerament es van barrejar 5 ml de la mostra a analitzar amb 5 ml de cloroform; aquest procediment es va realitzar per duplicat amb la finalitat d'obtenir dues lectures de cada mostra. Totes les mostres es van passar pel vòrtex durant 3 min. a una velocitat de 1.800 rpm i posteriorment es van centrifugar a 12.500 rpm amb una temperatura de 22 °C durant 15 min.

Després de la centrífuga es van obtenir en cada tub dues fases ben diferenciades: la fase inferior formada per cloroform i β - carotè i la fase superior (blanca i d'aspecte escumós) composta per oli i altres components. Es va extreure el sobrenedant de cada mostra i es van tornar a afegir els 5 ml de cloroform, repetint el procediment de la centrifugació. En la segona centrifugació es va treure el sobrenedant i la fase inferior es barreja amb la fase inferior de la primera centrifugació.

Finalment, es mesura l'absorbància de la mostra a 450 nm a través de l'espectrofotòmetre (Ultrospec 3000 pro GE Healt Sciences, USA). Es van dur a terme dues repeticions per cada mostra.

4.2.6.Contingut de vitamina E

Per tal de conèixer el contingut de vitamina E present en cada nanoemulsió i fracció micel·lar es va procedir a fer la seva extracció. Primerament es van barrejar 15 ml de la mostra a analitzar amb 15 ml d'una solució prèviament preparada d'hexà:metanol (60:40 v/v) que conté BHT (Butil hidroxitolueno) durant 3 min. Després la mostra es va centrifugar a 12.500 rpm a una temperatura de 4 °C durant 10 min. La solució resultant es va filtrar i el dissolvent es va evaporar amb el rotavapor fins a 35 °C.

Al residu obtingut, es van afegir 0'5 g d'àcid ascòrbic, 20 ml de metanol i 5 ml de KOH metanòlic saturat. La barreja es va saponificar durant 30 min. i la vitamina E es va extreure amb hexà en un embut de decantació. El dissolvent es va evaporar en un rotavapor a 35 °C. El residu es va dissoldre amb 5 ml d'hexà per fer-ne l'anàlisi per cromatografia d'alta resolució (HPLC: High-performance liquid chromatography).

L'anàlisi de vitamina E es va dur a terme mitjançant la injecció de 20 µl de la mostra. Per l'anàlisi, es va utilitzar una columna de fase C₁₈ reservada (Hypersil ODS, 5 microl partícules esfèriques, 250x4'6 mm i.d.)(Technochroma, Barcelona, Spain), eluïda amb una barreja de metanol:aigua (96:4, v/v). Els cromatogrames es van monitoritzar amb un detector de fluorescència (Hewlett-Packard, mod. HP-1046A)(Palo Alto, CA, USA) a una longitud d'ona d'excitació de 296 nm i una longitud d'ona d'emissió de 340 nm. La duració de l'anàlisi cromatogràfic va ser aproximadament de 25 min. Es van dur a terme dues repeticions per mostra i els resultats es van expressar en ppm.

4.2.7.Determinació de la bioaccessibilitat

Per tal de determinar la bioaccessibilitat del β - carotè i de la vitamina E presents en les diferents nanoemulsions preparades, es va fer ús de la següent fórmula:

$$\text{Bioaccessibilitat} = \frac{[\text{micel} \cdot \text{lar}]}{[\text{inicial}]} \times 100$$

En l'anterior fórmula els valors [micel·lar] i [inicial] corresponent a la concentració de β-carotè i de vitamina E en la fracció micel·lar i a la concentració d'aquests en la nanoemulsió inicial, respectivament.

4.2.8.Anàlisis estadístic

A partir dels resultats obtinguts es va calcular la mitjana i la desviació estàndard. Per tal d'analitzar els resultats obtinguts i extreure conclusions, es van analitzar els resultats amb el programa estadístic Statgraphics Centurion per a Windows (Statistical Graphics Co., Rockville, Md).

En primer lloc es va analitzar la variança amb una ANOVA Multifactorial, en la qual es van comparar les mitjanes obtingudes en tots els paràmetres. A continuació es va utilitzar el test de la mínima diferència significativa (LSD- Least Significant Difference) per tal d'establir diferències significatives entre les mitjanes amb un nivell de significació del 95%.

5. RESULTATS I DISCUSSIÓ

5.1. Mida de partícula i índex de polidispersió

La mida de partícula de les nanoemulsions analitzades es mostra en la Figura 8.

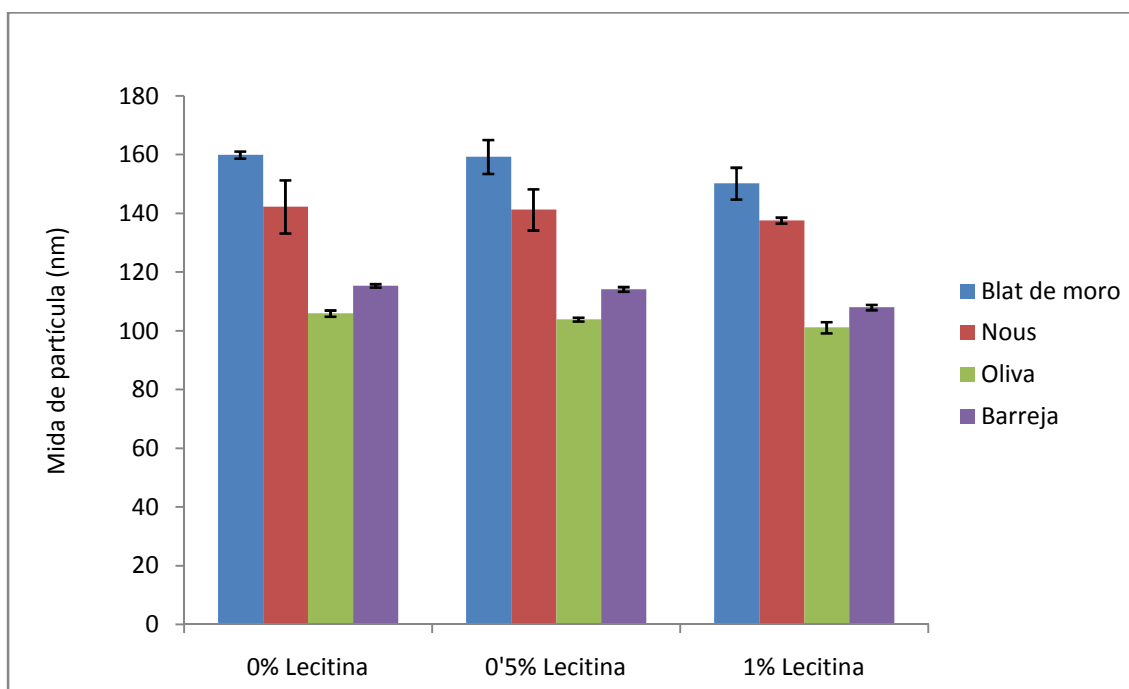


Figura 8: Mida de partícula de les nanoemulsions analitzades

La mida de partícula de les nanoemulsions estudiades va oscil·lar entre 101 i 125 i 159 i 945 nm, fet que demostra l'efecte del procés de microfluidització en les emulsions. En general les nanoemulsions presenten una mida de partícula entre 50 i 500 nanòmetres. Així doncs, podem afirmar que en l'estudi s'han aconseguit emulsions amb una mida de partícula nanomètrica. Els valors de les mides de partícula són molt similars als observats en d'altres estudis. Un d'aquests estudis és el de Burapapadh et. al. (2010), en el qual es van elaborar nanoemulsions amb una mida de partícula entre 200 i 400 nanòmetres. En un altre estudi, on també es van preparar varies nanoemulsions amb olis similars als que s'han fet anar en aquest estudi, es van obtenir uns valors de la mida de partícula entre 50 i 310 nanòmetres (Zhou et al., 2010).

Si observem la mida de partícula de cada nanoemulsió en funció del contingut de lecitina que les componia, podem veure que no hi ha diferències estadísticament significatives entre les diferents mostres ($p \geq 0.05$).

Així doncs, segons els resultats d'aquest estudi, no hi ha una relació entre la quantitat de lecitina present en una nanoemulsió i la mida de partícula d'aquesta. Per contra, d'altres estudis que han treballat amb majors concentracions de lecitina ($> 2\%$), indiquen que un increment en la concentració de lecitina de les mostres condueix a un augment de la mida de partícula. En l'estudi de Zhou et. al. (2010), en el que s'estudien les propietats fisicoquímiques de diferents mostres amb lecitina, s'observa que un augment en la concentració de lecitina a partir de $2'5$ i fins a $7'5\%$ va resultar en una disminució de la mida de partícula. En un altre estudi de Qian i McClements (2011) es van obtenir resultats similars respecte a la relació entre l'addició de lecitina i la mida de partícula. Així doncs, s'ha vist que al incrementar l'adsorció de molècules de surfactant a la interfase aigua - oli, es produeix una disminució en la tensió interfacial que facilita la formació de gotes més petites (Saber et. al., 2013). La mida de partícula d'una nanoemulsió tendeix a disminuir quan la relació de tensioactiu respecte d'oli és elevada, és a dir, a majors concentracions de lecitina. D'aquesta manera, es produeix una millor solubilització de l'oli en aigua, fet que condueix a una reducció de la mida de les gotes d'oli de la solució (Ostertag, 2012). Per contra, quan el percentatge de lecitina incorporat en la nanoemulsió és molt baix, la relació de tensioactiu respecte d'oli és petita i, per tant, la mida de les partícules és major. Això passa perquè hi ha una menor quantitat de tensioactiu i l'oli no es solubilitza tant bé en aigua.

A més a més d'existir una concentració mínima de lecitina a partir de la qual s'observa una reducció de la mida de partícula, també s'ha pogut observar que hi ha una concentració crítica de lecitina a partir de la qual una major addició d'aquest surfactant no causa una major disminució de la mida de partícula (Schubert i Müller-Goymann, 2005). Per aquesta raó, l'estudi suggereix que un excés de lecitina possiblement podria formar multicapes al voltant de les partícules que conduirien a la formació de liposomes, micel·les mixtes o d'altres agregats com els que van ser descrits per Heiati et. al. (1996) i Westesen i Siekmann (1997).

Pel que fa a les variacions en la mida de les partícules en funció de l'oli utilitzat per elaborar la nanoemulsió, es van observar diferències significatives ($p \leq 0'05$). Les nanoemulsions preparades a base d'oli d'oliva són les que van presentar una mida de partícula inferior mentre que les nanoemulsions elaborades amb oli de blat de moro són les que van presentar una mida de partícula superior.

Recentment s'han estudiat nanoemulsions a base d'oli de blat de moro (Lee i McClements, 2010), oli d'oliva (Wulff - Pérez et al., 2009) i oli de nous (Gharibzahedi et. al., 2012). En tots aquests estudis la mida de partícula obtinguda ha estat similar als valors d'aquest estudi sent, en tots els casos, inferior a 500 nm.

En les figures 9, 10, 11 i 12 podem observar la distribució de la mida de partícula de totes les nanoemulsions estudiades.

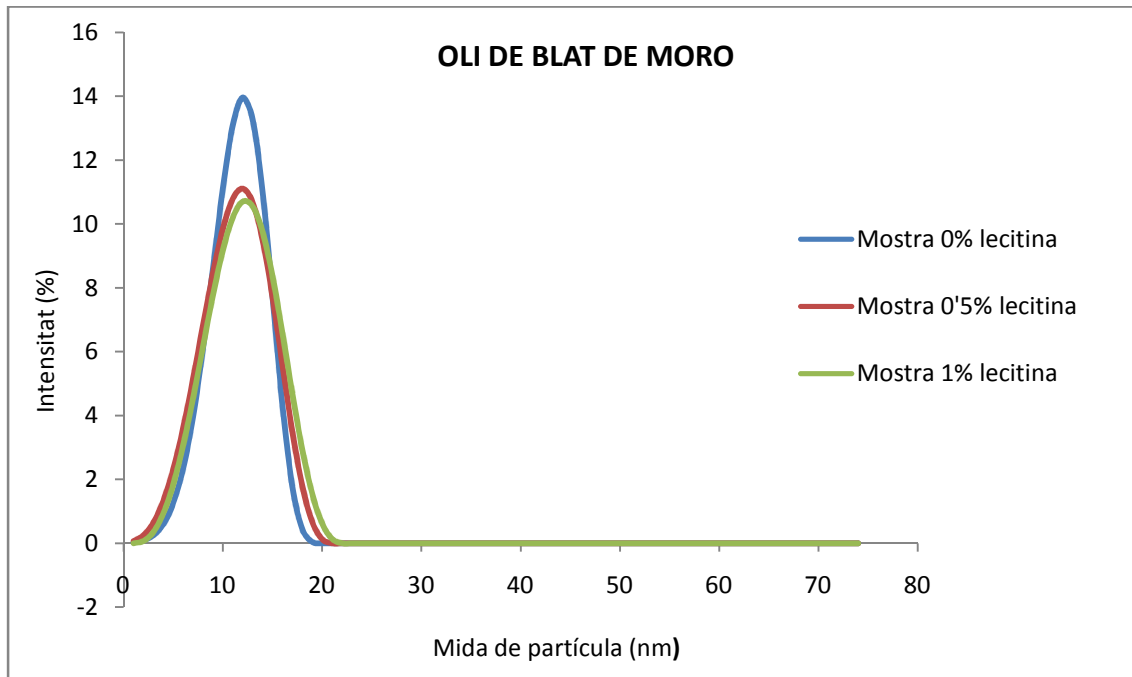


Figura 9: Distribució de la mida de partícula de les nanoemulsions d'oli de blat de moro

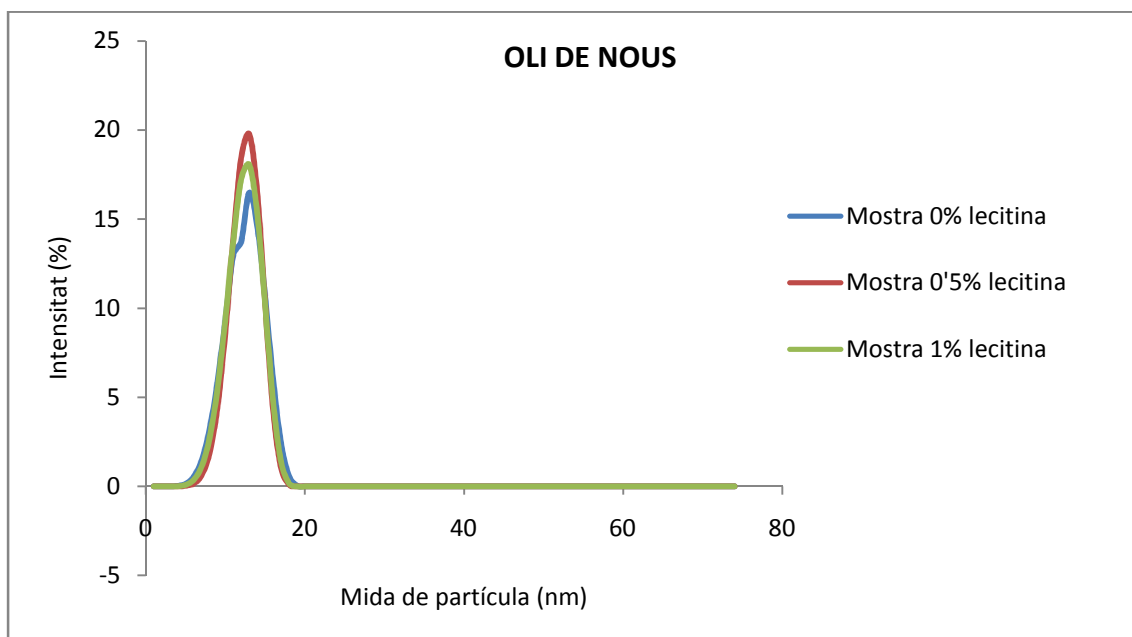


Figura 10: Distribució de la mida de partícula de les nanoemulsions d'oli de nous

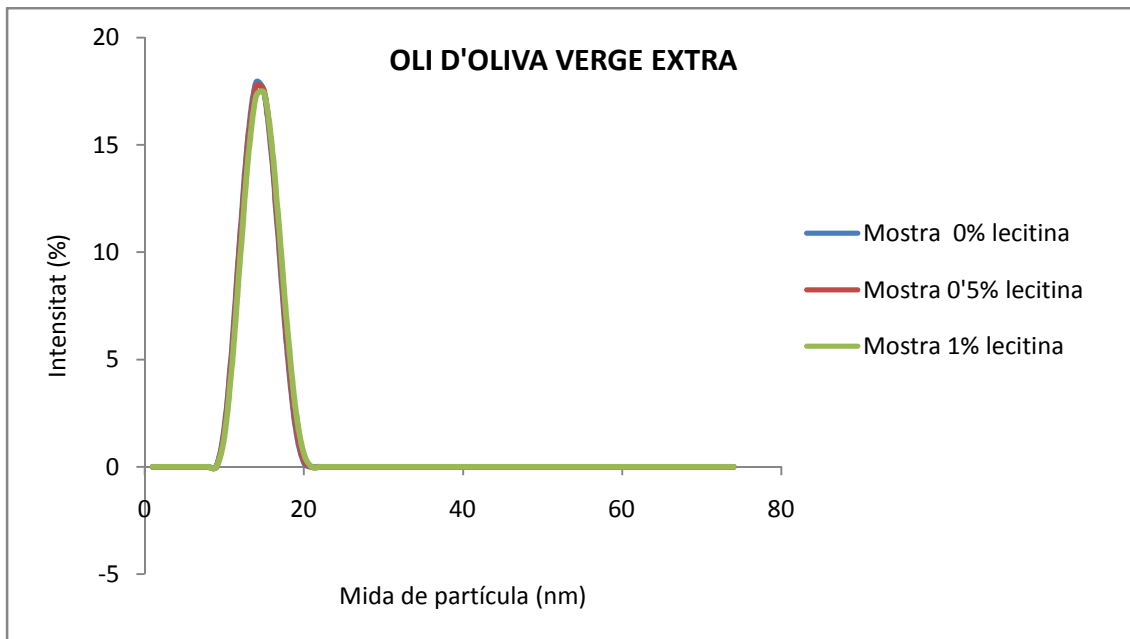


Figura 11: Distribució de la mida de partícula de les nanoemulsions d'oli d'oliva verge

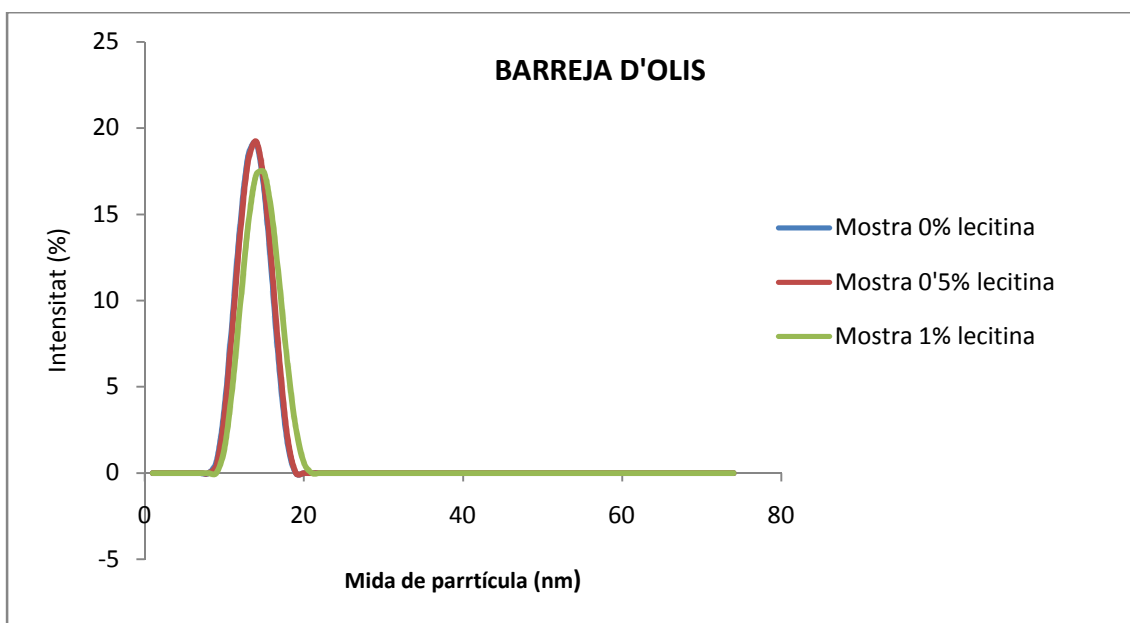


Figura 12: Distribució de la mida de partícula de les nanoemulsions de barreja d'olis

Tal com podem observar en les gràfiques de distribució de la mida de partícula (Figures 8-12), la distribució de totes les nanoemulsions estudiades oscil·la entre 10 i 20 nanòmetres. Sembla que no hi ha diferències substancials entre les mostres amb diferent contingut de lecitina.

Les dades obtingudes sobre l'índex de polidispersió de les diferents nanoemulsions preparades en aquest estudi, s'observen en la Taula 8.

Taula 8: Índex de polidispersió de les nanoemulsions analitzades

TIPUS D'OLI	% LECITINA	IPD
Blat de moro	0	0,244
Blat de moro	0'5	0,224
Blat de moro	1	0,237
Nous	0	0,312
Nous	0'5	0,283
Nous	1	0,312
Oliva verge extra	0	0,417
Oliva verge extra	0'5	0,420
Oliva verge extra	1	0,425
Barreja	0	0,387
Barreja	0'5	0,393
Barreja	1	0,413

Tal com s'observa en la Taula anterior, tots els valors de l'índex de polidispersió obtinguts oscil·len entre 0'224 i 0'425.

L'índex de polidispersió ens informa sobre si la mostra és homogènia o no. Aquest paràmetre acostuma a oscil·lar entre 0'1 i 1. Quan el valor de l'índex de polidispersió és alt, és indicatiu de que el rang de mida de partícula és ampli i, per tant, la mostra és poc homogènia. En canvi, quan aquest valor s'aproxima més al 0 que al 1, significa que la mostra és més homogènia.

Tal com s'observa en la Taula 8, les nanoemulsions formades amb la barreja d'olis i amb l'oli d'oliva verge extra són les que presenten un índex de polidispersió major, mentre que les nanoemulsions preparades amb oli de blat de moro són les que mostren un índex de polidispersió menor. No s'ha trobat cap influència significativa dels components de cada nanoemulsió en els valors obtinguts d'aquest índex.

5.2. Potencial zeta

El potencial zeta mesurat en totes les nanoemulsions es presenta en la Figura 13.

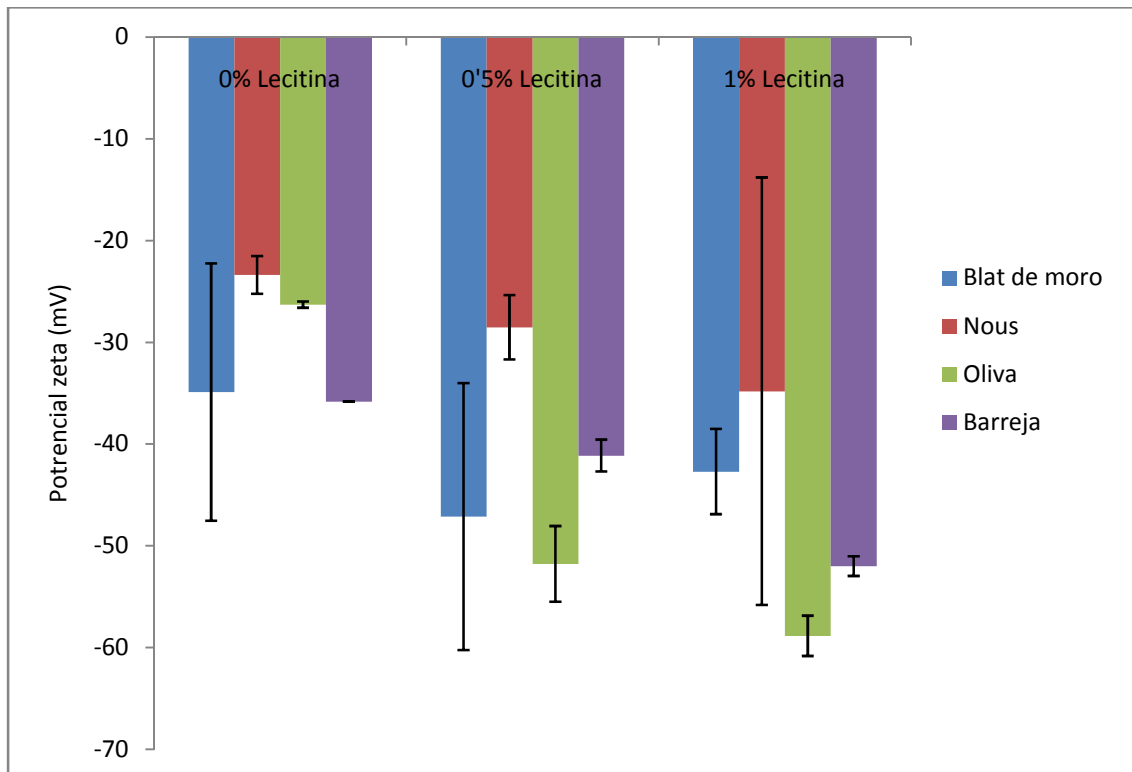


Figura 13: Potencial zeta de les nanoemulsions analitzades

En el present estudi el potencial zeta oscil·la entre -58'86 i -23'39 mV. Tots els valors de les nanoemulsions estudiades son negatius ja que els surfactants (tween 20 i lecitina) aporten grups carregats negativament a la interfase d'oli. S'ha observat que el tween 20 és capaç d'aportar una carga negativa a les gotes d'oli degut a l'adsorció d'hidroxil a partir de la fase aquosa o bé per la presència d'impureses anióniques com poden ser els àcids grassos lliures (McClements, 2005).

El potencial zeta és un paràmetre que ens permet conèixer la càrrega superficial que hi ha entre les nanopartícules. Quan els valors d'aquesta càrrega són superiors a +30mV o bé inferiors a -30mV són indicatius d'estabilitat ja que significa que les partícules de l'emulsió es repelen entre sí i eviten els fenòmens de coalescència i floculació, en els quals les petites gotes de la fase d'oli s'uneixen i formen gotes de mida major (Heurtault et. al., 2003).

Els resultats obtinguts sobre el potencial zeta mostren diferències significatives en aquest paràmetre entre les mostres formades amb un 0% de lecitina i les compostes

per un 1% de lecitina ($p \leq 0'05$). En canvi, no s'observen diferències del potencial zeta entre les mostres elaborades amb un 0% de lecitina i les preparades amb un 0'5% d'aquest surfactant. Aquests resultats suggereixen que es requereix una concentració mínima de lecitina per tal de que es produeixi un increment del potencial zeta.

En altres estudis no s'ha observat cap diferència significativa entre la concentració de lecitina present en la nanoemulsió i el seu potencial zeta. Un d'aquests estudis és el de Schubert i Müller-Goymann (2005) en el que els seus resultats van mostrar que les nanoemulsions formades a partir de diferents percentatges de lecitina presentaven valors molt similars de potencial zeta, suggerint que no hi ha relació entre ambdós paràmetres.

Els valors de potencial zeta de les mostres preparades amb diferents tipus d'oli no són significativament diferents ($p \geq 0'05$). Totes les mostres formades per diferents olis mostren un potencial zeta similar.

5.3. Viscositat

En la Figura 14 es mostren els resultats de la viscositat de les diferents nanoemulsions estudiades.

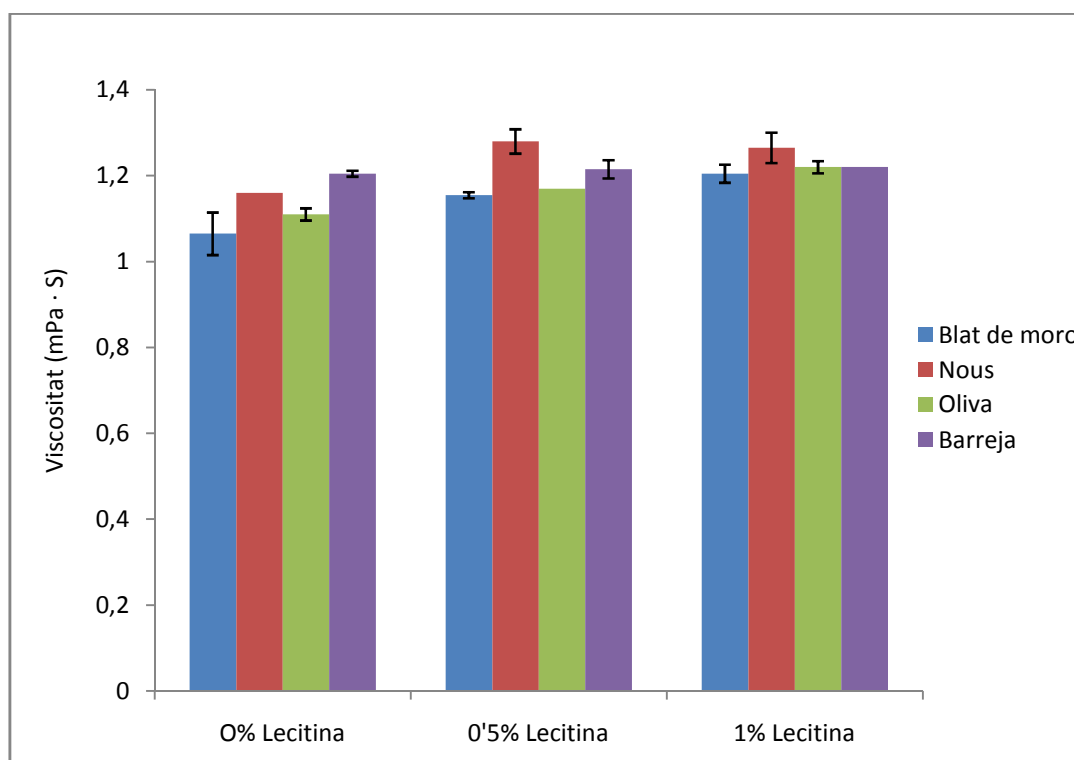


Figura 14: Viscositat de les nanoemulsions analitzades

Tal com s'observa en la Figura 14, els valors de viscositat obtinguts són molt similars en totes les mostres oscil·lant entre 1'06 i 1'28 mPa·s.

Els valors de viscositat de les mostres amb un 0% de lecitina són significativament menor als observats en les mostres amb un 1% de lecitina ($p \leq 0'05$). Aquest augment de la viscositat al incrementar la concentració de lecitina fins al 1% també s'ha observat en d'altres estudis com el de Zhou et. al. (2010).

En aquest estudi no s'ha observat cap relació entre la mida de partícula i la viscositat de la nanoemulsió. En canvi, en d'altres estudis s'ha observat que la viscositat de la nanoemulsió influeix en la velocitat en la que les molècules de surfactant es mouen des de la fase orgànica a la fase aquosa. Aquest fet suggereix que quan la viscositat és menor, les molècules de surfactant es poden moure més ràpidament i, per tant, es produeixen gotes de mida més petita (Saberí et. al., 2013). Altres estudis, com el de Walstra (1993), també van observar que la mida de partícula de les nanoemulsions disminueix al mateix temps que la viscositat i la tensió interfacial. Per contra, alguns autors han suggerit que quant més gran és la mida de la gota, menor és la viscositat de l'emulsió (Chanamai i McClements, 2000; Cortés-Muñoz et. al., 2009; Derkach, 2009; Pal, 2011).

Els resultats d'aquest estudi també mostren que no hi ha diferències de viscositat relacionades amb el tipus d'oli que forma cada nanoemulsió. Totes les mostres elaborades amb diferents tipus d'oli mostren uns valors similars de viscositat. Això podria ser degut a que tots els olis, en general, es caracteritzen per presentar una textura i una viscositat similar.

5.4. Color

En la Figura 15 es representen els resultats de l'índex de blancor, calculat a partir de les coordenades a^* , b^* i L^* determinades per cada nanoemulsió.

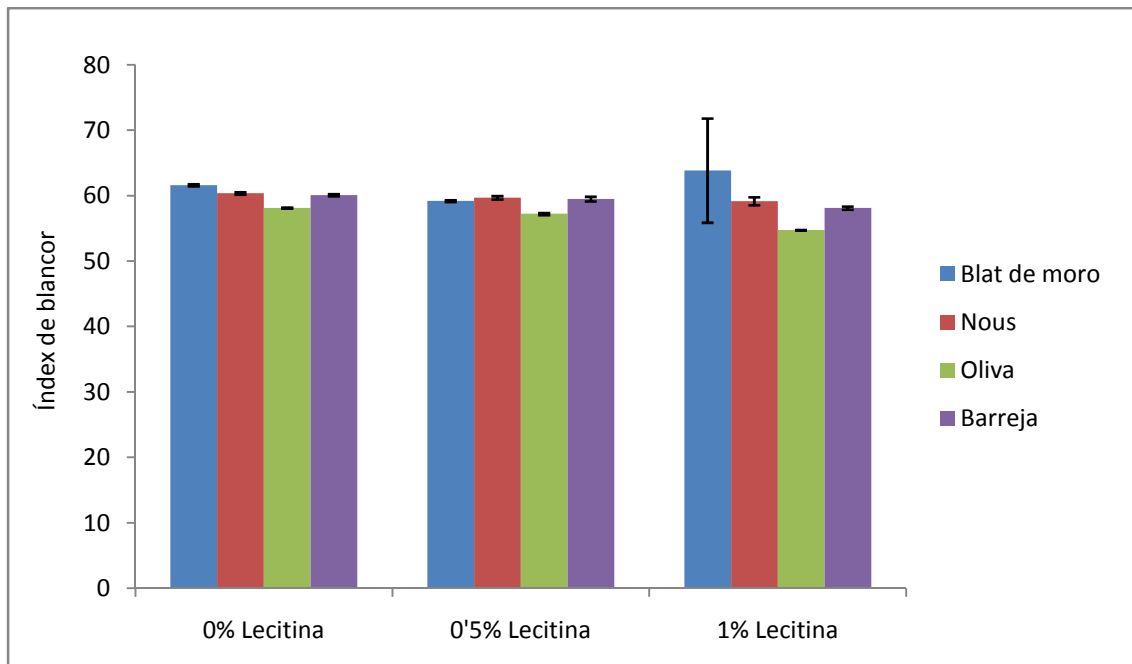


Figura 15: Color de les nanoemulsions analitzades

Els valors de l'índex de blancor obtinguts en aquest estudi oscil·len entre 54'73 i 63'87. L'índex de blancor és un paràmetre colorimètric que ens permet conèixer l'opacitat de l'emulsió, de manera que a major índex de blancor, major opacitat presenta la nanoemulsió.

En l'estudi de Trados et. al. (2004) es va observar que totes les nanoemulsions preparades amb una mida de partícula oscil·lant entre 50 i 200 nanòmetres eren transparents o translúcides. Els resultats d'altres estudis com el de Solans et. al. (2005) també mostren una correlació entre una inferior mida de partícula i una major translucidesa o transparència degut a que una mida de partícula més petita condueix a una dispersió de la llum més baixa. En aquest estudi, on la mida de partícula de totes les nanoemulsions formades ha oscil·lat entre 101'125 i 159'945nm, no s'han observat mostres transparents tot i que sí translúcides.

En els resultats obtinguts en aquest estudi no s'observen diferències significatives en l'índex de blancor en funció del percentatge de lecitina afegit en cada nanoemulsió ($p \geq 0'05$). Així doncs, no s'ha observat cap correlació entre l'índex de blancor de les mostres i la quantitat de lecitina d'aquestes.

Estudis anteriors com el de McClements (2011) i Salvia-Trujillo (2011 i 2013) van demostrar que les partícules grans dispersen la llum amb més intensitat i causen un increment en la lluminositat, opacitat i índex de blancor de la nanoemulsió. Els

resultats obtinguts en l'estudi de McClements (2011) i Salvia-Trujillo (2011 i 2013) també mostren diferències estadísticament significatives de l'índex de blancor entre els diferents tipus d'olis utilitzats per preparar les nanoemulsions.

En aquest estudi, els resultats també mostren diferències significatives de l'índex de blancor entre els diferents tipus d'olis utilitzats ($p \leq 0.05$). Les mostres elaborades a partir d'oli de blat de moro són les que han presentat un major índex de blancor, mentre que les nanoemulsions formades a partir d'oli d'oliva verge extra són les que han presentat un índex de blancor menor. Aquestes diferències són degudes al color inicial de la matriu alimentària, és a dir, de l'oli utilitzat. Aquest color és el que determina, en gran mesura, el color que obté finalment la nanoemulsió.

5.5. Estabilitat

Les nanoemulsions poden perdre estabilitat durant l'emmagatzematge. La inestabilitat de l'emulsió durant l'emmagatzematge és una conseqüència dels mecanismes fisicoquímics que es donen de manera espontània (Harnsilawat et al., 2006). Alguns d'aquests fenòmens són la coalescència, la floculació, la clarificació i la sedimentació. L'estabilitat d'una emulsió es pot millorar a través de l'ús d'emulsionants fortament estabilitzadors (Sun et. al., 2007).

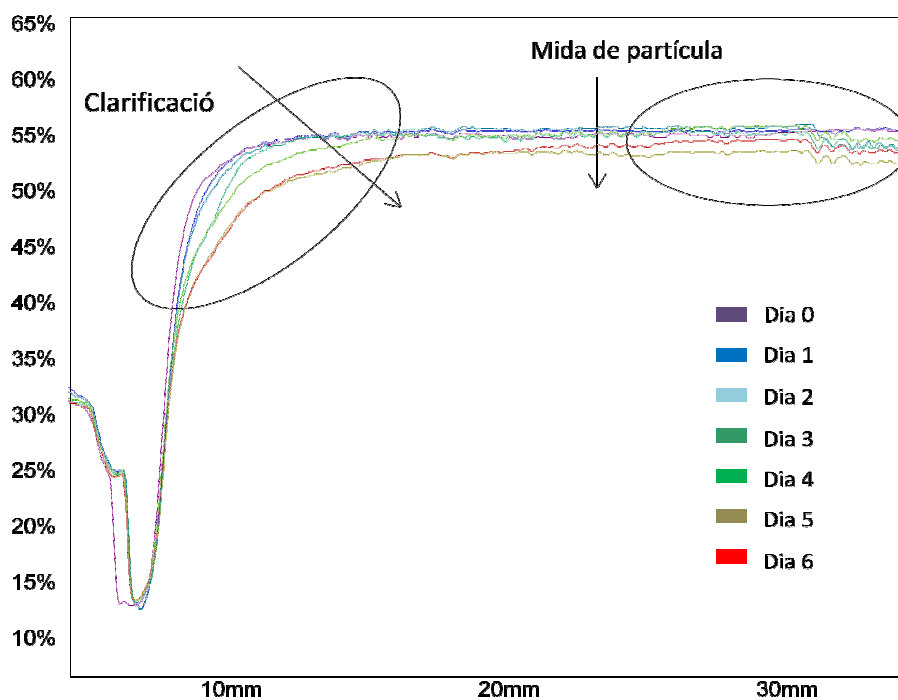


Figura 16: Estabilitat de les nanoemulsions analitzades

La Figura 16, corresponent a la nanoemulsió preparada a partir de la barreja d'olis i amb un 1% de lecitina incorporat, és representativa de la resta de mostres, ja que els resultats d'estabilitat de les mostres analitzades són molt semblants.

En aquesta Figura es pot observar que l'estabilitat de la mostra varia a mesura que passen els dies.

En totes les mostres analitzades s'han observat fenòmens de **clarificació**, és a dir, caiguda progressiva de les partícules en suspensió fins al fons del recipient on estaven emmagatzemades. En la Figura es pot observar aquest fenomen amb una gran disminució del nivell de retrodispersió en la part inferior de la mostra.

A més a més, un altre canvi que s'observa en les mostres al llarg del temps és l'**augment de la mida de partícula**. Aquest increment es degut a fenòmens de floculació i de coalescència.

La floculació és un procés químic que es caracteritza per l'aglomeració de partícules desestabilitzades presents en l'aigua. Aquest procediment es pot observar en emulsions quan les partícules entren en contacte i s'empeguen entre sí, procés inestable que condueix a un increment de la mida de partícula (Argaman i Kaufman, 1970; Feigin i Napper, 1980)

El procés de coalició - coalescència consisteix és el procediment en el que dos dominis de fase de composició essencialment idèntica entren en contacte per formar un domini de fase major, és a dir, representa la unió de dues partícules o materials en un sol cos. D'aquesta manera, els fenòmens de coalescència també condueixen a un augment de la mida de partícula de les mostres.

5.6. Digestibilitat

La digestió *in vitro* es va dur a terme en les nanoemulsions que van presentar les millors característiques fisicoquímiques, que van ser les elaborades amb un 1% de lecitina.

La digestibilitat es va valorar a través del percentatge d'àcids grassos lliures (%AGL) ja que aquest percentatge indica la quantitat d'àcids grassos dels triglicèrids que s'han alliberat durant el procés de la digestió.

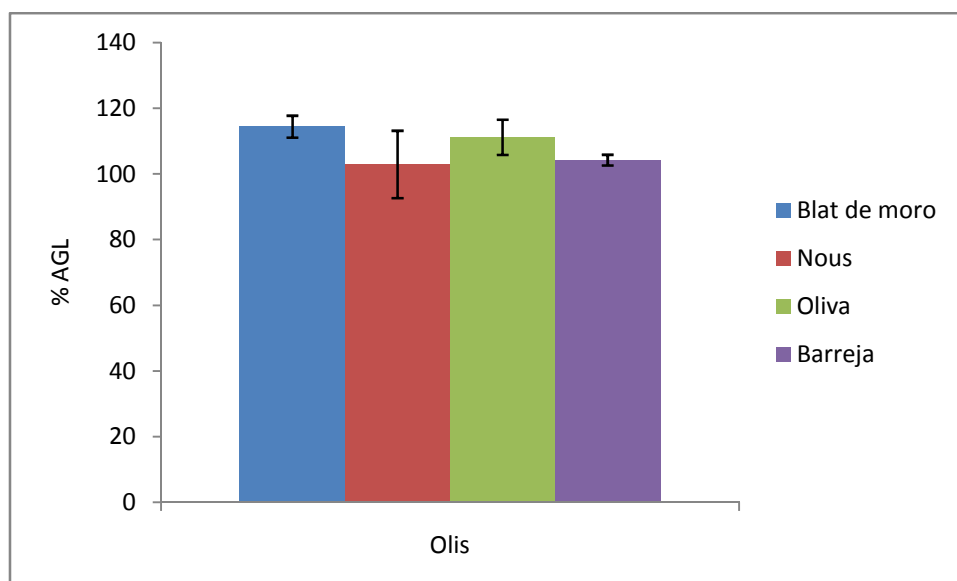


Figura 17: Digestibilitat de les nanoemulsions analitzades

Tal com s'observa en la Figura 19, els valors de digestibilitat obtinguts en aquest estudi oscil·len entre 102'95 i 114'45%. Els resultats indiquen que s'estan produint àcids grassos lliures en les nanoemulsions com a resultat de la conversió de triacilglicèrids en àcids grassos lliures i monoglicèrids per acció de la lipasa pancreàtica (McClements i Li, 2010).

Els resultats d'aquest estudi no mostren diferències significatives en la digestibilitat de l'oli de les diferents nanoemulsions estudiades. Així doncs, sembla que el tipus d'oli no influeix en la digestibilitat d'aquests.

En estudis com el de Qian et. al. (2012), es van analitzar les diferències en el procés de digestió i en la digestibilitat d'olis no digeribles (oli de taronja) i d'olis digeribles (oli de blat de moro). En aquest treball es van observar pocs canvis en el pH durant la digestió *in vitro* de les mostres que contenen el lípid no digerible ja que al no generar-se àcids grassos lliures, pràcticament no es va necessitar àlcali per neutralitzar el pH. No obstant, la petita quantitat d'àlcali alliberada durant aquest procediment es va relacionar amb la digestió de l'agent tensioactiu no iònic utilitzat (tween 20). Alguns tensioactius no iònics tenen enllaços ester que són susceptibles a la digestió per la lipasa pancreàtica, fet que condueix a l'alliberació d'àcids grassos lliures en el temps (Li i McClements, 2011). En canvi, es va observar que les nanoemulsions elaborades amb olis digeribles, com en aquest estudi, van presentar un augment progressiu de la quantitat d'àlcalis necessària per neutralitzar el pH durant els primers 30 minuts de la

digestió, després dels quals es va aconseguir un valor relativament constant (Qian et. al., 2012). Per tant, els valors de digestibilitat superiors a 100 obtinguts en aquest estudi podrien ser deguts a la digestió del tensioactiu (Lecitina o Tween 20).

En un altre estudi recent s'ha observat que la naturalesa de l'oli de la mostra té un impacte considerable en la digestió de la nanoemulsió (Ahmed et. al., 2012). En l'estudi de Ahmed et. al. (2012) ha quedat reflectit que la velocitat i el grau d'alliberació d'àcids grassos lliures és més ràpid per les nanoemulsions que contenen triglicèrids de cadena mitja (MCT) que per aquelles que tenen triglicèrids de cadena llarga (LCT). Aquest efecte va ser atribuït al fet de que els productes resultants de la digestió dels LCT tenien tendència a acumular-se en la interfase oli - aigua, inhibint així l'activitat de la lipasa pancreàtica (Sek et. al., 2006). D'altra banda, els productes de la digestió dels MCT no acostumen a acumular-se i presenten moviment en la fase aquosa, permetent a la lipasa pancreàtica continuar la seva acció en la interfase oli - aigua. En canvi, en aquest treball i en d'altres estudis com el de Qian et. al. (2012) no s'ha observat aquest efecte sinó que s'ha vist que la taxa i l'extensió de la digestió dels lípids ha estat similar per totes nanoemulsions preparades, continguin MCT o bé LCT (com la majoria dels nostres olis).

5.7. Bioaccessibilitat del β -carotè

La determinació de la bioaccessibilitat del β -carotè es va dur a terme en les nanoemulsions que van presentar les millors característiques fisicoquímiques, que van ser les elaborades amb un 1% de lecitina.

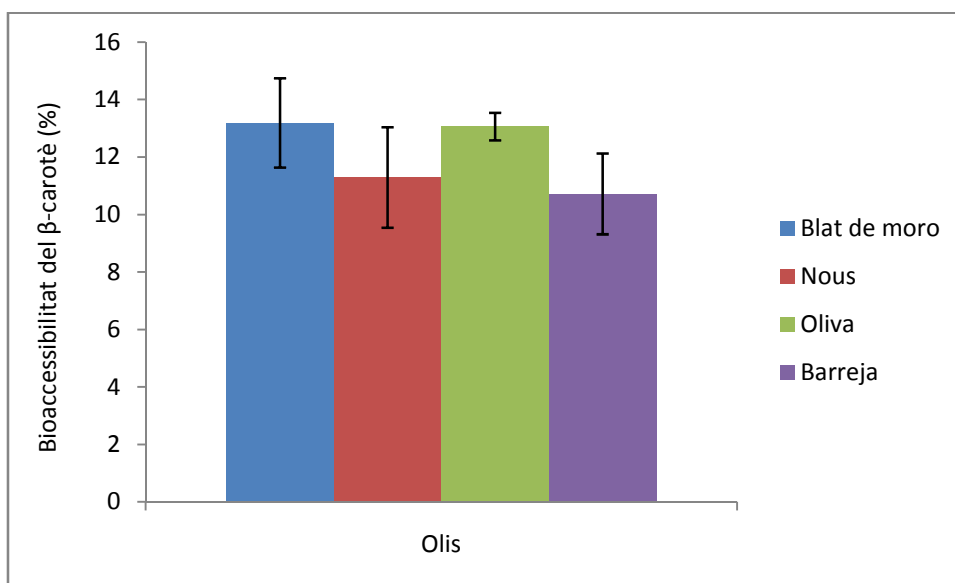


Figura 18: Bioaccessibilitat del β -carotè

Tal com s'observa en la Figura 17, els valors de bioaccessibilitat del β - carotè oscil·len entre 10'72 i 13'19% per les nanoemulsions estudiades.

Segons els resultats d'aquest estudi no es mostren diferències significatives entre la bioaccessibilitat del β -carotè de les diferents mostres ($p \geq 0'05$).

Així doncs, sembla que el tipus d'oli utilitzat no influeix en la bioaccessibilitat d'aquest component bioactiu. En canvi, en d'altres estudis ha quedat reflectit que la bioaccessibilitat del β - carotè depèn clarament del tipus de vehicle lipídic present en la nanoemulsió. En l'estudi de Qian et. al. (2012) es van analitzar nanoemulsions elaborades amb oli de taronja i oli de blat de moro i van observar valors més baixos de bioaccessibilitat del β - carotè en les nanoemulsions que contenien oli de taronja. Es va suggerir que aquest efecte podia ser atribuït al fet de que els olis com l'oli de taronja no son digeribles i, per tant, després de la digestió hi ha poques micel·les mixtes formades capaces de solubilitzar i transportar els ingredients lipofílics (Fatouros i Mullertz, 2008). A més a més, en l'estudi de Qian et. al. (2012) també es va observar que, tot i que els MCT i LCT de les nanoemulsions estaven pràcticament digerits, es van donar grans diferències en la bioaccessibilitat del β - carotè (2% i 66% en les nanoemulsions amb MCT i LCT respectivament). Els LCT són més propers a la formació de micel·les que els MCT i les micel·les formades tenen una capacitat de solubilització més gran degut a les majors dimensions del nucli hidrofòbic. Altres estudis també estan d'acord en que hi ha una major bioaccessibilitat quan s'utilitzen LCT enlloc de MCT (Kossena et. al., 2003; Nielsen et. al., 2001).

L'oli de blat de moro, l'oli d'oliva i l'oli de nous contenen àcids grassos de cadena relativament llarga (Qian et. al., 2012) mentre d'altres olis com el de coco o el de palma, contenen majoritàriament àcids grassos de cadena mitja. Així doncs, podria ser que no s'hagin observat diferències significatives en la bioaccessibilitat del β - carotè entre els diferents olis utilitzats en aquest estudi ja que tots ells són molt similars en quant a la concentració d'àcids grassos, contenint més àcids grassos de cadena llarga que de cadena curta.

5.8. Bioaccessibilitat de la vitamina E

La determinació de la bioaccessibilitat de la vitamina E es va dur a terme en les nanoemulsions que van presentar les millors característiques fisicoquímiques, que van ser les elaborades amb un 1% de lecitina.

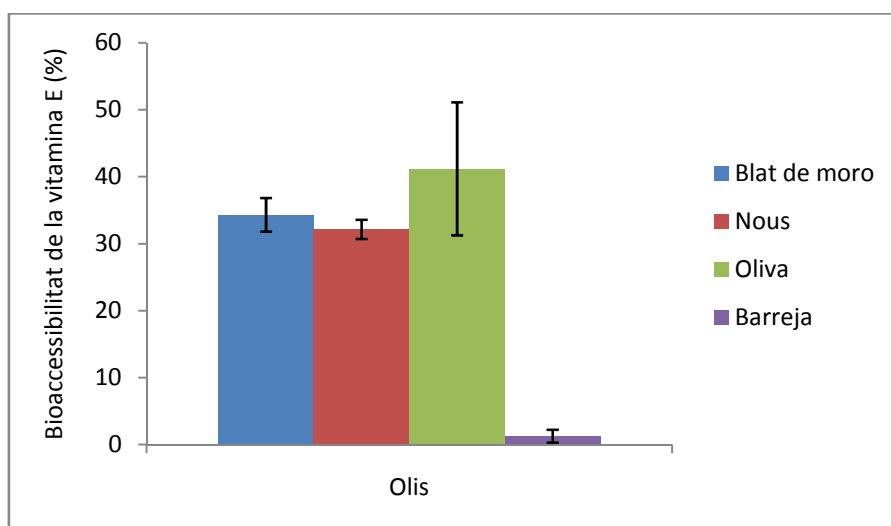


Figura 19: Bioaccessibilitat de la vitamina E

Tal com s'observa en la Figura 18, els valors de bioaccessibilitat de la vitamina E obtinguts en aquest estudi oscil·len entre 1'26% (nanoemulsió formada amb la barreja d'olis) i 41'19% (nanoemulsió d'oli d'oliva).

Segons els resultats d'aquest estudi s'observen diferències significatives respecte a la bioaccessibilitat de la vitamina E en les diferents mostres ($p \leq 0'05$). Així doncs, sembla que el tipus d'oli utilitzat per preparar la nanoemulsió influeix en la bioaccessibilitat d'aquest component bioactiu. La bioaccessibilitat de la vitamina E de la nanoemulsió elaborada amb una barreja d'olis ha set significativament menor que la obtinguda en la resta de nanoemulsions.

En l'estudi de Yang i McClements (2013) es va observar que la bioaccessibilitat total de la vitamina E després de la digestió va ser major en les nanoemulsions preparades amb LCT que amb les que contenen MCT, fet que va atribuir-se a la major capacitat de solubilització de micel·les mixtes formades a partir de LCT.

En un altre estudi, on també s'han estudiat les diferències en la bioaccessibilitat de la vitamina E en funció de l'oli formador de la nanoemulsió i, més a més, en funció del

mètode de preparació de la mostra (alta energia o baixa energia), no es van observar diferències significatives en les diferents nanoemulsions (Mayer et. al., 2013).

S'ha vist en alguns estudis que la presència de vitamina E en les nanoemulsions inhibeix la degradació del β -carotè. Tot i així, la vitamina E és menys efectiva que qualsevol altre antioxidant soluble en aigua o en oli, com el coenzim Q10 (Qian et. al., 2012). La vitamina E no resulta ser un antioxidant molt eficaç per si mateix ja que l'esterificació del tocoferol amb àcid acètic redueix la seva reactivitat química (Gregory, 2008). Tot i així, l'enllaç ester de la vitamina E es hidrolitza en el tub digestiu humà, a partir del qual s'allibera la molècula antioxidant de tocoferol (Gregory, 2008). Tal hi com s'ha esmentat anteriorment, en aquest treball no s'han observat diferències en la bioaccessibilitat del β - carotè entre les diferents mostres.

6. CONCLUSIONS

- I. Les nanoemulsions presenten diàmetres de partícula de rang nanomètric, valors molt menors que les emulsions convencionals. A més a més, s'ha observat que l'addició de surfactant (lecitina) redueix el diàmetre de partícula.
- II. Totes les nanoemulsions obtingudes, tal com ens indica els índex de polidispersió, son homogènies, de manera que es demostra una correcta microfluidització.
- III. La concentració de lecitina incorporada en la nanoemulsió afecta al potencial zeta. Al incrementar la quantitat de lecitina de 0 a 1% el potencial zeta és més negatiu. Així doncs, a més concentració de lecitina, menor mobilitat elèctrica presenten les gotes de la nanoemulsió.
- IV. Un augment del 0 al 1% de lecitina condueix a un increment dels valors de viscositat de les nanoemulsions preparades amb diferents tipus d'olis.
- V. El tipus d'oli utilitzat per formar la nanoemulsió influeix en els valors de l'índex de blancor d'aquesta. Les nanoemulsions formades amb oli de blat de moro són les que presenten un major índex de blancor, mentre que les formades amb oli d'oliva verge extra mostren uns valors d'índex de blancor menors.
- VI. Les diferents nanoemulsions presenten una estabilitat molt similar en el temps. A mesura que passen els dies, les nanoemulsions experimenten fenòmens de clarificació i la mida de les partícules incrementa progressivament. Aquest augment de la mida de partícula es deu principalment a fenòmens de floculació i coalescència que es donen de manera espontània.
- VII. La digestibilitat és un paràmetre que en aquest estudi no s'ha vist influenciat pel tipus d'oli present en la nanoemulsió, ja que tots els olis seleccionats tenen un contingut molt similar d'àcids grassos.
- VIII. La bioaccessibilitat del β -carotè no es veu afectada per la naturalesa de l'oli utilitzat per l'elaboració de la nanoemulsió. En canvi, la bioaccessibilitat de la vitamina E disminueix significativament en la nanoemulsió elaborada a base de barreja d'olis.
- IX. Les nanoemulsions presenten múltiples avantatges front les emulsions convencionals ja que tenen unes millors característiques fisicoquímiques i faciliten la incorporació de components bioactius en matrius alimentaries.

7. BIBLIOGRAFIA

AHMED, K.; LI, Y.; MCCLEMENTS, D. J.; XIAO, H. (2012). Nanoemulsion-and emulsion-based delivery systems for curcumin: encapsulation and release properties. *Food Chemistry*, 132(2), 799-807.

ÁLVAREZ CRUZ N.S; BAGUE SERRANO A.J (2011). Los alimentos funcionales: una oportunidad para una mejor salud. 155-188.

ARGAMAN, Y.; KAUFMAN, W. J. (1970). Turbulence and flocculation. *Journal of the Sanitary Engineering Division*, 96(2), 223-241.

ARMSTRONG, Gregory A.; HEARST, John E. Carotenoids 2: Genetics and molecular biology of carotenoid pigment biosynthesis. *The FASEB Journal*, 1996, vol. 10, no 2, p. 228-237.

BAILEY, A. E. (1961). Aceites y grasas industriales. Reverté.

BRIGELIUS-FLOHÉ, R.; KELLY, F. J.; SALONEN, J. T.; NEUZIL, J.; ZINGG, J. M.; AZZI, A. (2002). The European perspective on vitamin E: current knowledge and future research. *The American journal of clinical nutrition*, 76(4), 703-716.

CHAUDHRY, Q.; SCOTTER, M.; BLACKBURN, J.; ROSS, B.; BOXALL, A.; CASTLE, L.; WATKINS, R. (2008). Applications and implications of nanotechnologies for the food sector. *Food additives and contaminants*, 25(3), 241-258.

CARMEN, D.; FERNÁNDEZ, F.; CARMEN, L.; FEBLES, S.; BERNABEU, A.S.; GARCÍA, B.E (2002). Artículos de revisión, 40(1), 28-32.

CHANAMAI, R.; MCCLEMENTS, D. J. (2000). Dependence of creaming and rheology of monodisperse oil-in-water emulsions on droplet size and concentration. *Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects*, 172(1), 79-86.

CONSTANTE, E.G. (2006). Los aceites y grasas: Composición y propiedades.

CONTRERAS, F.S. (2005). Tratado de Nutrición. (Á.G. Hernández, Ed.)(pp. 659-690).

CORTÉS-MUÑOZ, M.; CHEVALIER-LUCIA, D.; DUMAY, E. (2009). Characteristics of submicron emulsions prepared by ultra-high pressure homogenisation: Effect of chilled or frozen storage. *Food hydrocolloids*, 23(3), 640-654.

DERKACH, S. R. (2009). Rheology of emulsions. *Advances in Colloid and Interface Science*, 151(1), 1-23.

FATOUROS, D. G.; MULLERTZ, A. (2008). In vitro lipid digestion models in design of drug delivery systems for enhancing oral bioavailability.

FEIGIN, R. I.; NAPPER, D. H. (1980). Depletion stabilization and depletion flocculation. *Journal of Colloid and Interface Science*, 75(2), 525-541.

GHARIBZAHEDI, S. M. T.; MOUSAVI, S. M.; HAMED, M.; KHODAIYAN, F.; RAZAVI, S. H. (2012). Development of an optimal formulation for oxidative stability of walnut-beverage emulsions based on gum arabic and xanthan gum using response surface methodology. *Carbohydrate polymers*, 87(2), 1611-1619.

GONNET, M.; LETHUAUT, L.; BOURY, F. (2010). New trends in encapsulation of liposoluble vitamins. *Journal of Controlled Release*, 146(3), 276-290.

HEIATI, H.; PHILLIPS, N. C.; TAWASHI, R. (1996). Evidence for phospholipid bilayer formation in solid lipid nanoparticles formulated with phospholipid and triglyceride. *Pharmaceutical research*, 13(9), 1406-1410

HEURTAULT, B.; SAULNIER, P.; PECH, B.; PROUST, J. E.; BENOIT, J. P. (2003). Physico-chemical stability of colloidal lipid particles. *Biomaterials*, 24(23), 4283-4300.

HUANG, Q.; YU, H.; RU, Q. (2010). Bioavailability and delivery of nutraceuticals using nanotechnology. *Journal of Food Science*, 75(1), R50-R57.

JÁUREGUI, M. E. C.; CARRILLO, M. D. L. C. C.; ROMO, F. P. G. (2011). Carotenoides y su función antioxidante: Revisión.

KOSSENA, G. A.; BOYD, B. J.; PORTER, C. J.; CHARMAN, W. N. (2003). Separation and characterization of the colloidal phases produced on digestion of common formulation

lipids and assessment of their impact on the apparent solubility of selected poorly water-soluble drugs. *Journal of pharmaceutical sciences*, 92(3), 634-648.

LEE, S. J.; MCCLEMENTS, D. J. (2010). Fabrication of protein-stabilized nanoemulsions using a combined homogenization and amphiphilic solvent dissolution/evaporation approach. *Food Hydrocolloids*, 24(6), 560-569.

MAYER, S.; WEISS, J.; MCCLEMENTS, D. J. (2013). Vitamin E-enriched nanoemulsions formed by emulsion phase inversion: factors influencing droplet size and stability. *Journal of colloid and interface science*, 402, 122-130.

MCCLEMENTS, D.J. (2005). "Handbook OF Industrial Water Soluble Polymer". Disponible a: http://books.google.es/books/about/Handbook_of_Industrial_Water_Soluble_Pol.htm?id=E_uuzF-PCHwC&redir_esc=y.

MCCLEMENTS, D.J. (2011). "Edible nanoemulsions: Fabrication, properties and functional performance". *Soft Matter*, num. 7, p. 2297 - 2316.

MELÉNDEZ-MARTÍNEZ, A. J.; VICARIO, I. M.; HEREDIA, F. J. (2004). Importancia nutricional de los pigmentos carotenoides. *Archivos Latinoamericanos de Nutrición*, 54(2), 149-154.

MENDOZA, Y. (1999). Sustancias bioactivas en los alimentos. Retrieved from [www.unizar.es/med_naturista/bioactivos en alimentos.pdf](http://www.unizar.es/med_naturista/bioactivos%20en%20alimentos.pdf)

MUÑOZ, J.; ALFARO, M. D. C.; ZAPATA, I. (2007). Avances en la formulación de emulsiones. *Grasas y aceites*, 58(1), 64-73.

OSTERTAG, F.; WEISS, J.; MCCLEMENTS, D. J. (2012). Low-energy formation of edible nanoemulsions: factors influencing droplet size produced by emulsion phase inversion. *Journal of colloid and interface science*, 388(1), 95-102.

PAL, R. (2011). Rheology of simple and multiple emulsions. *Current Opinion in Colloid & Interface Science*, 16(1), 41-60.

QUIAN, C.; DECKER, E.; XIAO, H.; McCLEMENS, D. (2012). "Physical and chemical stability of β -carotene enriched nanoemulsions: influence of pH, ionic strength, temperature and emulsifier type". *Food Chemistry*, num. 132: p. 1221-1229.

QIAN, C.; MCCLEMENTS, D. J. (2011). Formation of nanoemulsions stabilized by model food-grade emulsifiers using high-pressure homogenization: factors affecting particle size. *Food Hydrocolloids*, 25(5), 1000-1008.

RAO, M. A. (2009). Nanoscale particles in food and food packaging. *Journal of food science*, 74(9), viii-viii.

RAO, J.; MCCLEMENTS, D.J. (2011). Formation of flavor oil microemulsions, nanoemulsions and emulsions: influence of composition and preparation method. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 59(9), 5026-35. doi: 10.1021/jf200094m.

REBOUL, E.; RICHELLE, M.; PERROT, E.; DESMOULINS-MALEZET, C.; PIRISI, V.; BOREL, P. (2006). Bioaccessibility of carotenoids and vitamin E from their main dietary sources. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 54(23), 8749-8755.

SABERI, A. H.; FANG, Y.; MCCLEMENTS, D. J. (2013). Fabrication of vitamin E-enriched nanoemulsions: factors affecting particle size using spontaneous emulsification. *Journal of colloid and interface science*, 391, 95-102.

SAHOO, S. K.; PARVEEN, S.; PANDA, J. J. (2007). The present and future of nanotechnology in human health care. *Nanomedicine: Nanotechnology, Biology and Medicine*, 3(1), 20-31.

SALVIA TRUJILLO, L.; ROJAS GRAÜ, M.A.; SOLIVA FORTUNY, R.; MARTÍN BELLOSO, O. (2013). "Effect of processing parameters on physicochemical characteristics of microfluidized lemongrass essential oil-alginate nanoemulsions". *Food Hydrocolloids*, num. 30: p. 401-407.

SCHUBERT, M. A.; MÜLLER-GOYMANN, C. C. (2005). Characterisation of surface-modified solid lipid nanoparticles (SLN): influence of lecithin and nonionic emulsifier. *European journal of pharmaceutics and biopharmaceutics*, 61(1), 77-86.

SOLANS, C.; IZQUIERDO, P.; NOLLA, J.; AZEMAR, N.; GARCIA-CELMA, M. J. (2005). Nano-emulsions. *Current Opinion in Colloid & Interface Science*, 10(3), 102-110.

TABLAS DE COMPOSICIÓN DE ALIMENTOS DEL CESNID, 2004. McGraw-Hill. Interamericana ISBN: 84-486-0590X.

TADROS, T.; IZQUIERDO, P.; ESQUENA, J.; SOLANS, C. (2004). Formation and stability of nano-emulsions. *Advances in colloid and interface science*, 108, 303-318.

URANGO-MARCHENA, L. A. U.; PARRA, G. A. M.; QUIROZ, M. A. C.; HENAO, D. C.; ZAPATA, P. A.; MIRA, L. L.; GÓMEZ, B. D. (2011). Efecto de los compuestos bioactivos de algunos alimentos en la salud. *Perspectivas en Nutrición Humana*, 11(1), 27-38.

WALSTRA, P. (1993). Principles of emulsion formation. *Chemical Engineering Science*, 48(2), 333-349.

WEISS, J.; TAKHISTOV, P.; MCCLEMENTS, D. J. (2006). Functional materials in food nanotechnology. *Journal of food science*, 71(9), R107-R116.

WESTESEN, K.; SIEKMANN, B. (1997). Investigation of the gel formation of phospholipid-stabilized solid lipid nanoparticles. *International journal of pharmaceutics*, 151(1), 35-45.

WULFF-PÉREZ, M.; TORCELLO-GÓMEZ, A.; GÁLVEZ-RUÍZ, M. J.; MARTÍN-RODRÍGUEZ, A. (2009). Stability of emulsions for parenteral feeding: Preparation and characterization of o/w nanoemulsions with natural oils and Pluronic f68 as surfactant. *Food Hydrocolloids*, 23(4), 1096-1102.

YANG, Y.; MCCLEMENTS, D. J. (2013). Vitamin E bioaccessibility: Influence of carrier oil type on digestion and release of emulsified α -tocopherol acetate. *Food chemistry*, 141(1), 473-481.

ZHOU, H.; YUE, Y.; LIU, G.; LI, Y.; ZHANG, J.; GONG, Q.; DUAN, M. (2010). Preparation and characterization of a lecithin nanoemulsion as a topical delivery system. *Nanoscale research letters*, 5(1), 224-230.